



Naturalis

Repositorio Institucional

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Hongos patógenos de hemípteros auquenorrincos plaga de cultivos agrícolas : Evaluación de su capacidad biocida como agentes de control

Toledo, Andrea V.

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: López Lastra, Claudia C.

Co-dirección: Marino de Remes Lenicov, Ana María

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2006

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120126000053>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

“Hongos patógenos de hemípteros auquenorrincos plaga de cultivos agrícolas. Evaluación de su capacidad biocida como agentes de control”.



TESIS DOCTORAL

Lic. Andrea V. Toledo

Directora: Dra. Claudia C. López Lastra

Co-directora: Dra. Ana M. Marino de Remes Lenicov

2006

A mi madre por todo el amor que me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directoras Dra. Claudia López Lastra y Dra. Ana Marino de Remes Lenicov por haberme brindado tan cálidamente toda su experiencia y conocimientos durante el tiempo que compartimos juntas. Gracias por los momentos vividos, por las charlas, los consejos y todo aquello que hizo que cada día aprendiera algo nuevo, no sólo relacionado al trabajo, sino a la vida misma.

Agradezco infinitamente a Ana, a quién considero mí segunda mamá, el haberme iniciado con tanta profesionalidad, dedicación y cariño en el camino de la Ciencia.

A las Dras. Alda González y Graciela Navone por permitirme llevar a cabo mis estudios en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE).

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber financiado parcialmente los estudios de mi tesis doctoral.

A mis compañeras de trabajo y amigas del Museo: Eugenia, Inés, Isabel, Mariana, Roxana y Susana, quienes de una u otra manera siempre estuvieron presentes para ayudar en lo que fuera necesario. A todas ellas les agradezco infinitamente el cálido compañerismo que me manifestaron desde mis comienzos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Ana Clara, Arnaldo, Augusto, Cecilia, Gerardo, Gustavo, Juan, Luis, Mariana, Nahuel, Sebastián, Vanesa y Victoria y a todo el personal del CEPAVE por toda su ayuda.

Al Sr. Emilio Topa, la Sra. Patricia Sarmiento y el Sr. Rafael Urrejola por su asistencia técnica.

A las Dras. Analía Lanteri, Cecilia Melo, Nora Cabrera, Susana Paradell y al Prof. Armando Cicchino por el tiempo cedido para ayudarme en la identificación de algunos insectos.

Al Dr. Eduardo Virla, en compañía de quien he trabajado en algunas oportunidades y quién desde Tucumán, incondicionalmente siempre ha estado presente y dispuesto a brindar su ayuda y su buen humor.

A la Ing. Agr. Susana Padín, la Dra. Marcela Schneider y los Dres. Richard Humber, Walter Gams y Martijn ten Hoopen por la amabilidad con la que han respondido a mis inquietudes.

A todos los quinteros del cinturón hortícola de La Plata y a los Ingenieros Agrónomos Marcelo Asborn, Rodolfo Bezus (Estación Experimental Julio Hirschhorn, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP) y Enrique Figueroa (INTA Mercedes, Corrientes) por permitirnos efectuar los muestreos en sus cultivos.

A los directivos y el personal del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini por la mantención de algunas cepas fúngicas en su cepario.

A mi marido y a toda mi familia quienes siempre estuvieron a mi lado brindándome su ayuda y compañerismo. Les agradezco por demostrarme que en la vida las cosas que se consiguen con esfuerzo son las que nos dan las más grandes satisfacciones.

INDICE	Págs.
RESUMEN	7
ABSTRACT	9

CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL.

I.1. Generalidades acerca de los Hemiptera	11
I.2. Los Auchenorrhyncha y la importancia fitosanitaria de las familias Delphacidae y Cicadellidae en cultivos cerealeros	11
I.3. Especies de Delphacidae y Cicadellidae de reconocida capacidad vectora en la Argentina	12
I.4. Enemigos naturales de los Delphacidae y Cicadellidae	14
I.5. Los hongos entomopatógenos como agentes potenciales de control biológico	15
OBJETIVOS PROPUESTOS PARA EL PRESENTE ESTUDIO	17
HIPOTESIS	17

CAPITULO II. Relevamiento, identificación, aislamiento y caracterización de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha asociados a cultivos cerealeros y malezas aledañas.

II.1. INTRODUCCION	18
II.2. MATERIALES Y METODOS	18
II.2.1. Relevamiento e identificación de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha	18
II.2.2. Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha	21
Aislamiento de hongos Hypocreales a partir de los insectos hospedadores	21
Aislamiento de hongos Hypocreales a partir de muestras de suelo	22
Aislamiento de hongos Entomophthorales a partir de los insectos hospedadores	22
Caracterización de hongos entomopatógenos	23
II.3. RESULTADOS Y DISCUSION	25
II.3.1. Relevamiento e identificación de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha	25
Relevamiento de especies fúngicas a partir de insectos	25
Relevamiento de especies fúngicas a partir de muestras de suelo	42
II.3.2. Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha	43
II.4. CONCLUSIONES	56

CAPITULO III. Evaluación de la patogenicidad de hongos Hypocreales contra Delphacidae y Cicadellidae vectores de patógenos al maíz

III.1. INTRODUCCION	58
III.2. MATERIALES Y METODOS	59
III.2.1. Cría de insectos para pruebas de patogenicidad	59
III.2.2. Cultivo de maíz como hospedante para pruebas de patogenicidad	61
III.2.3. Pruebas de patogenicidad	61
Selección de aislamientos fúngicos	61
Evaluación de la patogenicidad del aislamiento fúngico seleccionado	65
III.3. RESULTADOS Y DISCUSION	65
Selección de aislamientos fúngicos	65
Evaluación de la patogenicidad del aislamiento fúngico seleccionado	67
III.4. CONCLUSIONES	71

CAPITULO IV. Histopatología de adultos de *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae) causada por los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales).

IV.1. INTRODUCCION	73
IV.2. MATERIALES Y METODOS	73
IV.2.1. Estudios de patogenicidad y sintomatología	73
IV.2.2. Estudios histopatológicos	75
IV.2.2.1 Observación de los eventos de adhesión, germinación y penetración de conidios fúngicos a través de la cutícula del hospedador	75
IV.2.2.2 Observación de los eventos de multiplicación de los hongos entomopatógenos dentro del insecto hospedador	76
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSION	77
IV.3.1. Estudios de patogenicidad y sintomatología	77
IV.3.2. Estudios histopatológicos	80
IV.3.2.1 Observación de los eventos de adhesión, germinación y penetración de los conidios fúngicos a través de la cutícula del hospedador	80
IV.3.2.2 Observación de los eventos de multiplicación de los hongos entomopatógenos dentro del cuerpo del insecto hospedador	85
IV.4. CONCLUSIONES	91

CAPITULO V. Estacionalidad y prevalencia de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha asociados a cultivos de arroz.

V.1. INTRODUCCION	93
V.2. MATERIALES Y METODOS	94
V.2.1. Estudios de campo	94
V.2.2. Estudios de laboratorio	96
V.3. RESULTADOS Y DISCUSION	98
V.3.1. Recolección de insectos	98
V.3.2. Identificación y caracterización de hongos entomopatógenos aislados de <i>Oliarus dimidiatus</i>	102
V.3.3. Estacionalidad y prevalencia de hongos entomopatógenos aislados de <i>O. dimidiatus</i>	108
V.4. CONCLUSIONES	111
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	113
BIBLIOGRAFIA	116

Hongos patógenos de hemípteros auquenorrincos plaga de cultivos agrícolas. Evaluación de su capacidad biocida como agentes de control

Resumen. Los Hemiptera Auchenorrhyncha reúnen la mayor cantidad de especies vectoras de enfermedades a cultivos cerealeros, dentro de los cuales el maíz y el arroz representan los de mayor interés económico. Entre las especies vectoras que afectan al maíz en la zona tropical y templada de América del Sur, Centro América y el Caribe se destacan: *Peregrinus maidis* (Ashmead), *Delphacodes kuscheli* Fennah, *D. haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae) y *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), y como plagas de arroz: *Tagosodes orizicolus* Muir (Delphacidae). A escala mundial, el complejo de enemigos naturales de estos insectos está conformado por depredadores, parasitoides y patógenos. Entre los organismos entomopatógenos se destacan los hongos, los cuales poseen la particularidad de infectar a un gran número de artrópodos y de encontrarse en los hábitats más diversos. Como agentes de control de plagas resulta promisorio la utilización de productos formulados en base a estos microorganismos en Programas de Manejo Integrado. La mayoría de los registros concernientes al hallazgo y utilización de hongos entomopatógenos en Delphacidae y Cicadellidae provienen del continente Asiático, lo cual hace imprescindible abordar este tema a los fines de ampliar el conocimiento de los enemigos naturales de las principales plagas que afectan los cultivos cerealeros en la Argentina. En el presente trabajo de Tesis se propuso relevar y caracterizar los hongos patógenos de Hemípteros Auchenorrhyncha asociados principalmente a cultivos de maíz y malezas aledañas a los mismos; evaluar una selección de aislamientos fúngicos nativos contra Delphacidae y Cicadellidae de cría experimental; observar el modo de acción de los hongos entomopatógenos mediante el estudio de la histopatología de los insectos infectados, con el uso de microscopía óptica y electrónica de barrido; y estimar la estacionalidad y prevalencia de estos entomopatógenos en cultivos de arroz. En cultivos de maíz y malezas aledañas, se identificaron 11 géneros y 13 especies de hongos entomopatógenos. Las dos especies fúngicas más frecuentemente identificadas fueron *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Se incorporaron 22 nuevos insectos hospedadores pertenecientes a los órdenes Hemiptera, Coleoptera y Diptera contribuyendo a ampliar el espectro hospedador natural de los hongos entomopatógenos. Se logró obtener un total de 92 aislamientos fúngicos, de los cuales 65 fueron caracterizados morfológicamente y de acuerdo a la viabilidad, *in vitro*, de los conidios. Como resultado se obtuvieron 9 morfotipos de colonias para *B. bassiana* y 9 para *M. anisopliae*. En los ensayos de patogenicidad, luego de 14 días posteriores a la inoculación, tanto *D. kuscheli* (mortalidad de $73,28 \pm 9,0\%$) como *P. maidis* (mortalidad de $68,64 \pm 6,7\%$) fueron significativamente más susceptibles al aislamiento *B. bassiana* CEP 147 que los adultos de *D. maidis* (mortalidad de $49,94 \pm 9,7\%$). El tiempo medio de mortalidad registrado para *P. maidis* fue de 6,1 días, para *D. kuscheli* de 6,2 días y para *D. maidis* de 8,6 días. Si bien se observó una gran concentración de conidios de *B. bassiana* CEP 189 y *M. anisopliae* CEP 160 en todas las regiones del cuerpo de *P. maidis*, fueron escasos los propágulos de ambas especies fúngicas que emitieron tubos germinativos dentro de las 24, 48 y 72 horas posteriores a la

inoculación. La vía de penetración de los hongos más frecuentemente observada, fue directamente a través de la cutícula de las regiones esternales y cercanas a los pelos cuticulares. Los cuerpos hifales tanto de *M. anisopliae* como de *B. bassiana* comenzaron a evidenciarse dentro del cuerpo del hospedador entre el cuarto y quinto día posterior a la inoculación. Las mayores densidades de hifas se encontraron dispuestas en el tejido graso del abdomen y en la musculatura esquelética del tórax. En cultivos de arroz se detectaron infecciones fúngicas en *Oliarus dimidiatus* (Fulgoromorpha: Cixiidae), ocasionadas por *Pandora* sp., *Conidiobolus coronatus*, *Hirsutella* sp. y *Beauveria bassiana*, los cuales constituyen los primeros registros de hongos patógenos para esta especie de insecto en la Argentina. Las infecciones fúngicas fueron registradas casi sin interrupción desde mediados de febrero a mediados de abril de 2005 suprimiéndose desde entonces hasta fines de marzo de 2006. La especie fúngica dominante fue *Pandora* sp., afectando a 4,5% de los adultos de *O. dimidiatus* recolectados en el campo. De este porcentaje 4% fueron hembras y 0,5% machos, lo que demuestra una relación de infección de 8:1. La población de adultos de *O. dimidiatus* presentó una estacionalidad bien definida a lo largo de los 15 meses de muestreo; las mayores densidades de insectos se registraron entre los meses de febrero y abril de 2005, decayendo abruptamente durante mayo a octubre, para volver a aumentar a mediados de noviembre. Una estacionalidad similar fue registrada durante la segunda campaña. En cuanto al aspecto epidemiológico, los registros indicaron que las infecciones fúngicas se mantuvieron en un porcentaje mínimo, no detectándose epizootias sobre el cultivo de arroz durante las campañas 2004-2006.

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, control biológico, vectores, Auchenorrhyncha, Delphacidae, Cicadellidae, maíz, arroz.

Pathogenic fungi of Hemiptera Auchenorrhyncha pest of agricultural crops. Evaluation of its biocide capacity as control agents.

Abstract. The Hemiptera Auchenorrhyncha gathers the largest number of vector species of diseases to cereal crops, being maize and rice the most important ones. Among the vectors found mainly in the tropical and temperate areas of South America, Central America and the Caribbean, *Peregrinus maidis* (Ashmead), *Delphacodes kuscheli* Fennah, *D. haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae) and *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), affecting maize and *Tagosodes orizicolus* Muir (Delphacidae) as pest of rice, can be mentioned. Throughout the world, the group of natural enemies of the Auchenorrhyncha is conformed by predators, parasitoids and pathogens. Among the entomopathogens organisms, the fungi which have the particularity of infecting a large number of arthropods and being found in the most diverse habitats can be mentioned. As pest control agents it is promising to use products formulated on the basis of these organisms in Integrate Management Programs. The majority of the records concerning the finding and use of entomopathogenic fungi against Delphacidae and Cicadellidae come from Asia, which makes it necessary to deal with this issue in order to enlarge the knowledge of the natural enemies of the principal pests that affect cereal crops in Argentina. In the current PhD thesis study it is proposed to search for and characterize pathogenic fungi of Hemiptera Auchenorrhyncha associated mainly with corn crops and the weeds bordering them; evaluate a selection of native fungal isolates against experimentally reared Delphacidae and Cicadellidae; observe the entomopathogenic fungi way of acting under light and scanning electron microscopy through the study of the histopathology of the infected insects; and estimate the seasonality and prevalence of these entomopathogens in rice crops. In the corn crops and the weeds bordering them, 11 genera and 13 species of entomopathogenic fungi were recorded. The two most frequently found fungal species were *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Twenty-two new host insects belonging to Hemiptera, Coleoptera and Diptera orders were incorporated, enlarging the natural host range of the entomopathogenic fungi. A total of 92 fungal isolates was obtained, 65 of them were characterized morphologically and according to the conidial viability – *in vitro*. As a result, 9 morphological types of colony for *B. bassiana* and 9 for *M. anisopliae* were obtained. In the pathogenicity tests after 14 days postinoculation, both *D. kuscheli* (cumulative mortality of $73.28 \pm 9.0\%$) and *P. maidis* (cumulative mortality of $68.64 \pm 6.7\%$) were significantly more susceptible to the isolate *B. bassiana* CEP 147 than *D. maidis* (cumulative mortality of $49.94 \pm 9.7\%$). Median lethal time for *P. maidis* was 6.1 days, for *D. kuscheli*, 6.2 days, and for *D. maidis*, 8.6 days. Although a high concentration of conidia of *B. bassiana* CEP 189 and *M. anisopliae* CEP 160 was observed in all the regions of the *P. maidis* body, the propagules of both fungal species that emitted germ tubes within the 24, 48 and 72 hours postinoculation were scarce. The most frequently observed way of penetration of the fungi was through the cuticle of the sternal regions and the areas near to the cuticular hairs. The hyphal bodies of both *M. anisopliae* and *B. bassiana* started to evidence inside the host body between the fourth and the fifth day postinoculation. The highest densities of hyphae were found in the fat body of the abdomen and the muscle tissue of the

thorax. In rice crops fungal infections were found in *Oliarus dimidiatus* (Fulgoromorpha: Cixiidae), caused by *Pandora* sp., *Conidiobolus coronatus*, *Hirsutella* sp. and *Beauveria bassiana*, which constitute the first records of this insect species in Argentina. The fungal infections were recorded almost without interruption from about the middle of February to about the middle of April, 2005, ending from then until the end of March, 2006. The dominant fungal species was *Pandora* sp., affecting 4.5% of the *O. dimidiatus* adults collected in the field. From this percentage, 4% were females and 0.5% were males, which shows an infection relationship of 8:1. The adult population of *O. dimidiatus* showed a well defined seasonality throughout the fifteen-month sampling. The highest densities of insects were recorded between February and April, 2005, decreasing sharply from May to October, 2005, and increasing in mid-November. A similar seasonality was recorded during the second crop period. As regards the epidemiological aspect, the records showed that fungal infections remained at low percentages without finding epizootics on the rice crops between 2004 and 2006.

Key words: Entomopathogenic fungi, biological control, vectors, Auchenorrhyncha, Delphacidae, Cicadellidae, corn, rice.

CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL

I.1. Generalidades acerca de los Hemiptera

Los Hemípteros se alimentan en su mayoría de los fluidos de las plantas. Presentan un aparato bucal picador suctor, con los palpos atrofiados y el labio en forma de estuche surcado dorsalmente para alojar dos pares de estiletes (las mandíbulas y las maxilas modificadas). Son insectos heterometábolos y se encuentran representados en todas las regiones geográficas.

Dentro de los Hemiptera (= Homoptera) los Auchenorrhyncha agrupan a los infraórdenes Fulgoromorpha y Cicadomorpha. Entre los rasgos anatómicos más sobresalientes se destacan las antenas, con dos segmentos basales y un flagelo estiliforme, y los tarsos trisegmentados en el adulto. Ambos infraórdenes se diferencian por la siguiente combinación de caracteres: desarrollo del postclípeo, conformación del pedicelo antenal y de las estructuras sensoriales, presencia o ausencia de tégulas y la forma y disposición de las coxas medias.

Los Fulgoromorpha “planthoppers”, reúnen aproximadamente 9.000 especies distribuidas en 20 familias siendo Delphacidae la más numerosa con aproximadamente 2.000 especies descriptas (Wilson, 2005). Los Cicadomorpha comprenden aproximadamente 35.000 spp. incluidas en 3 superfamilias: Cicadoidea “cicadas”, Cercopoidea “froghoppers o spittlebugs” y Membracoidea “treehoppers”. Dentro de esta última superfamilia, los Cicadellidae “leafhoppers” representan la familia más numerosa, con aproximadamente 15.000 especies (Wilson & Claridge, 1991; Dietrich, 2005).

Se desarrollan a partir del estado de huevo y pasan por alrededor de cinco estadios ninfales, los que se alimentan de fluidos vegetales al igual que las formas adultas.

La gran mayoría de las especies obtienen su alimento desde el floema, aunque también lo hacen desde el xilema y mesófilo de plantas herbáceas y leñosas. Asimismo, algunos registros indican a los hongos, musgos o helechos como hospederos de alimentación (Wilson *et al.*, 1994; Wheeler, 2003).

I.2. Los Auchenorrhyncha y la importancia fitosanitaria de las familias Delphacidae y Cicadellidae.

La importancia fitosanitaria de los Delphacidae y Cicadellidae es reconocida en el mundo debido a la capacidad que poseen de vehiculizar diferentes fitopatógenos, como virus, micoplasmas, espiroplasmas y bacterias. Además de actuar como vectores de enfermedades provocan considerables daños mecánicos producidos durante la alimentación y la oviposición, así como por los derivados de la acción tóxica de la saliva que ocasionan necrosis de diferente grado de severidad. Reúnen la mayor cantidad de especies vectoras de enfermedades a cultivos cerealeros, dentro de los cuales el maíz y el arroz representan los de mayor interés económico.

En cuanto al maíz, durante la campaña 2004/05, la producción proveniente del Cono Sur fue de 60 millones de toneladas, representando 8,5% de la producción mundial; la Argentina, segunda en orden de importancia, contribuyó con 31,67% (<http://www.ruralarg.org.ar/>, 2005).

La producción mundial del cultivo de arroz, durante la campaña 2004, fue de aproximadamente 27 millones de toneladas; siendo Argentina y Uruguay los principales exportadores en América del Sur, aportando 315.000 y 625.000 toneladas respectivamente (<http://www.fao.org/>, 2004).

1.3 Especies de Delphacidae y Cicadellidae de reconocida capacidad vectora en la Argentina.

Dentro de los Auchenorrhyncha vectores de patógenos al maíz registrados en el continente americano, principalmente en la zona tropical de América del Sur, Centro América y el Caribe se destacan: *Peregrinus maidis* (Ashmead), *Delphacodes kuscheli* Fennah, *D. haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae) y *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) (Fig. 1).

Peregrinus maidis es una especie pantropical (Tsai & Wilson, 1986). En la Argentina su presencia fue registrada sobre maíz (*Zea mays* L. y *Z. perennis* (Hitchcock)), sorgo (*Sorghum vulgare* L. y *Sorghum halepense* L.), mijo (*Panicum miliaceum* L.), y citrus en Formosa, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Salta, Tucumán y Buenos Aires (Tesón & Remes Lenicov, 1989; Remes Lenicov & Virla, 1999b; Remes Lenicov & Mariani, 2001). Esta especie es reconocida en el mundo por transmitir de forma persistente propagativa cuatro virus diferentes: “Maize stripe virus” (MStpV), “Maize Iranian mosaic virus” (MIMV), “Maize mosaic virus” (MMV) y “Maize sterile stunt virus” (MSSV) (Nault & Ammar, 1989). Estos patógenos además del maíz pueden afectar también cebada, centeno, avena y trigo bajo condiciones experimentales (Chen *et al.*, 1996; Tsai & Falk, 1993). Recientes estudios en la Argentina durante la campaña 2000/01 permitieron detectar por primera vez, en cultivos con altas densidades de *P. maidis*, la presencia de un Rabdovirus (próximo al MMV) ocasionando la sintomatología propia de ese tipo de patógeno (Remes Lenicov *et al.*, 2002). En el año 2004 se demostró experimentalmente la capacidad de transmitir el Mal de Río Cuarto del Maíz (MRCV) (Virla *et al.*, 2004).

Delphacodes kuscheli y *D. haywardi* son especies nativas ampliamente representadas en la Argentina, entre los 30° y 36° de latitud Sur (Remes Lenicov & Virla, 1999b). Ambas son vectoras del MRCV (Remes Lenicov *et al.* 1985, Velázquez *et al.*, 2003), un Fijivirus recientemente considerado como una entidad diferente del conocido “Maize rough dwarf virus” (MRDV) distribuido en varios países Europeos y Asiáticos (Rodríguez Pardini *et al.*, 1998; Arneodo *et al.*, 2002). *Delphacodes kuscheli* representa el principal vector del virus que provoca esta severa enfermedad endémica que afecta económicamente el área maicera de la Argentina. El foco de esta virosis se encuentra en la zona próxima a la localidad de Río Cuarto (Córdoba), donde fue detectada por primera vez a fines de la década del 60 (Nome *et al.*, 1981). Desde entonces su distribución se fue ampliando progresivamente alcanzando en la actualidad gran parte del área

maicera argentina (Laguna *et al.*, 2002) y en consecuencia se registraron pérdidas que ascendieron a U\$S 120.000.000 durante la epifitia más severa, producida en la campaña 1997 (Lenardón *et al.*, 1999).

Dalbulus maidis es un cicadélido ampliamente distribuido en América tropical, encontrándose desde el Sur de Estados Unidos hasta zonas templadas de la Argentina (Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Chaco, Santiago del Estero, Córdoba, San Luís, Santa Fe y Buenos Aires (Virla *et al.*, 1990/91; Giménez Pecci *et al.*, 2002). En América tropical es considerada la especie de mayor interés por transmitir de forma persistente al maíz el “Maize rayado fino virus” (MRFV), el “Corn stunt Spiroplasma” (CSS) y el “Maize bushy stunt mycoplasma” (MBSM). El CSS es una de las enfermedades del maíz de mayor importancia económica en los Estados Unidos, Méjico y América Central y del Sur (Nault & Bradfute, 1979) siendo *D. maidis* la principal especie vectora (Nault & Bradfute, 1979, Giménez Pecci *et al.*, 2005; Ibarra - Aparicio *et al.*, 2005). En la Argentina, en el año 2000, fue detectada por primera vez en áreas restringidas del norte (Giménez Pecci *et al.*, 2000).

Una de las plagas del arroz más importantes en la zona tropical de América del Sur, Centro América y el Caribe es *Tagosodes orizicolus* Muir (Hemiptera: Delphacidae), la cual provoca daños directos a las plantas durante el acto alimentario e indirectos por la transmisión del virus: “Rice hoja blanca virus” (RHBV). Este delfácido es vector natural en América Central y del Sur y representa uno de los principales factores limitantes de la producción arroceras en América tropical, ocasionando pérdidas que oscilaron entre 50 y 90%. Si bien la Argentina constituye un área geográfica dónde aún no se ha detectado la enfermedad, la existencia del vector ha sido registrada en áreas cerealeras del Noreste (Mariani & Remes Lenicov, 2000/2001).

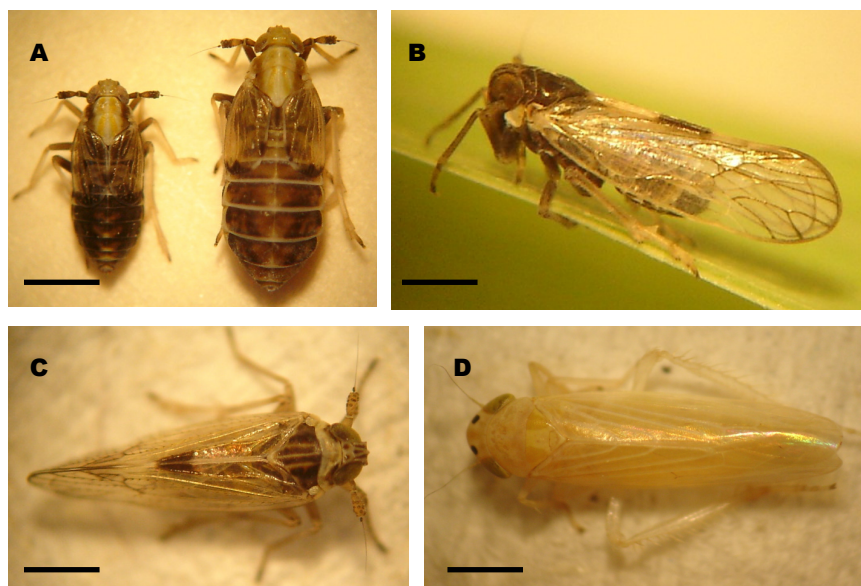


Fig. 1: Auchenorrhyncha vectores de patógenos al maíz representados en la Argentina. **A:** Adultos baquíferos de *P. maidis* (izquierda: macho, derecha: hembra). Escala: 1mm. **B:** Macho de *Delphacodes kuscheli* Escala: 0,5mm. **C:** Macho de *D. haywardi*. Escala: 0,6mm. **D:** Hembra de *Dalbulus maidis*. Escala: 0,8mm.

I.4. Enemigos naturales de los Delphacidae y Cicadellidae

El complejo de enemigos naturales de estos insectos está conformado por depredadores, parasitoides y patógenos.

A escala mundial, se conoce una gran diversidad de invertebrados que actúan como depredadores de los Auchenorrhyncha (Swezey, 1936; Rothschild, 1966; Chiu, 1979; Waloff, 1980), aunque los estudios realizados hasta el presente determinan que sólo algunos taxa juegan un papel importante en su dinámica poblacional (Döbel & Denno, 1993). En la Argentina sólo existe una cita referente a la depredación ejercida por *Doru lineare* (Eschscholtz) (Dermaptera: Forficulidae) sobre posturas de *D. maidis* (Mariani *et al.*, 1996).

Entre los enemigos naturales, los parasitoides han sido los más investigados en el ámbito mundial por su potencial como agentes de control biológico. Dentro de este grupo podemos diferenciar a aquellos que parasitan huevos (oófilos), de los que parasitan ninfas y adultos. Los parasitoides oófilos comprenden especies de Hymenoptera de las familias Trichogrammatidae, Mymaridae, Eulophidae y Aphelinidae, que según Freytag (1985) pueden alcanzar niveles de ataque cercanos al 100%. Algunos de los registros de parasitoides de huevos, de este grupo de insectos, más destacados para la Argentina son: *Paracentrobia subflava* (Girault) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Virla, 1999), *Anagrus armatus* (Ashmead), *Anagrus flaveolus* Waterhouse, *Anagrus breviphragma* Soyka y *Anagrus miriamae* Triapitsyn & Virla (Hymenoptera: Mymaridae) (De Santis *et al.*, 1988; Triapitsyn & Virla, 2004; Virla, 2000, 2001). Dentro de los parasitoides de ninfas y adultos se destacan entre otros: *Gonatopus bonaerensis* Virla, *Gonatopus caraibicus* (Olmi), *Gonatopus chilensis* (Olmi), *Gonatopus desantisi* (Olmi), *Gonatopus lauti* Virla, *Haplogonatopus hernandezae* Olmi, *Pseudogonatopus chilensis* Olmi (Hymenoptera: Dryinidae) (Olmi & Virla, 1993; Virla, 1992; Virla & Olmi, 1998; Virla 2000; Virla, 2004), *Cephalops penepauculus* (Hardy) (Diptera: Pipunculidae) (Virla & Rafael, 1997) y *Elenchus tenuicornis* (Kirby) (Strepsiptera: Elenchidae) (Remes Lenicov *et al.*, 1992).

Además de los depredadores y parasitoides, una considerable variedad de especies de hongos entomopatógenos ha sido registrada principalmente en delfácidos y cicadélidos plaga del arroz en China, Taiwán, Filipinas, Tailandia, Japón, Corea e India. Entre las especies fúngicas citadas se encuentran *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *B. brongniartii* (Saccardo) Petch, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *M. flavoviridae* Gams & Roszypal, *M. album* Petch, *Paecilomyces farinosus* (Holm) Brown & Smith, *Hirsutella citriformis* Speare (Ascomycota: Hypocreales), *Erynia delphacis* (Hori) Humber, *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko y *Entomophthora* sp. (Zygomycota: Entomophthorales) (Chu & Hirashima, 1981; Reissig *et al.*, 1986; Rombach *et al.*, 1987a, 1987b; Rice & Choo, 2000). Con motivo de combatir estas plagas en varias regiones del mundo algunos autores han evaluado la potencialidad de ciertos hongos para ser utilizados como agentes de control biológico contra estos insectos, obteniendo resultados alentadores (Rombach *et al.*, 1986a, 1986b; Aguda *et al.*, 1987; Holdom *et al.*, 1988; Lane *et al.*, 1991; Kanga *et al.*, 2004; Ibarra Aparicio *et al.*, 2005). Sin embargo en nuestro país no existen hasta el presente registros de hongos entomopatógenos infectando a delfácidos y cicadélidos, por

lo cual se hace imprescindible abordar este tema a los fines de contribuir a un Manejo Integrado de las principales plagas que afectan a los cultivos cerealeros.

I.5. Los hongos entomopatógenos como agentes potenciales de control biológico

El uso de los hongos entomopatógenos como posibles agentes de control de plagas de cultivos fue considerado por primera vez a fines del siglo XIX. En este período, en el que los insecticidas químicos sintéticos eran aún desconocidos, esta posibilidad de control se hizo muy popular entre los investigadores; aunque la mayor cantidad de estudios al respecto fueron llevados a cabo a partir de la década del '70 (Cantwell, 1974; Burges, 1981; Davidson, 1981; Ferron, 1985).

Desde entonces, los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados en todo el mundo, existiendo más de 700 especies reunidas en 100 géneros (Lecuona, 1996). Estos hongos tienen la particularidad de parasitar a un gran número de artrópodos y de encontrarse en los hábitats más diversos, ya sean acuáticos o terrestres. Como agentes microbianos de control de plagas pueden ser incluidos en un Manejo Integrado mediante la utilización de productos formulados en base a los mismos. Actualmente las especies que están siendo más estudiadas en relación a la transferencia tecnológica son *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith para el control de plagas de pasturas, suelo e invernáculos (Lecuona, 1996).

En nuestro país los primeros trabajos referentes al control microbiano de insectos plaga de la agricultura fueron publicados por Fawcett (1915) y Marchionatto (1934, 1935). Con posterioridad fueron varios los estudios referentes a esta temática llevados a cabo por distintos autores, entre los que se encuentran Ogloblin & Jauch (1943), Jauch & Ogloblin (1953), Fresa (1971, 1979), Crouzel (1973), Fresa *et al.* (1980), Dagoberto & Lecuona (1982), Sosa Gómez & Alves (1983, 1984), Yasem de Romero (1984a, b, 1985), Sosa Gómez *et al.* (1985), López Lastra (1988, 1989a y b), Díaz & Lecuona (1995), Vasicek *et al.* (1995), Lecuona & Díaz (2001), Edelstein (2002), Consolo *et al.* (2003), Edelstein & Lecuona (2003), Ghiggia *et al.* (2003); Berón & Díaz (2005), López Lastra & Scorsetti (2006).

El ciclo de infección generalizado de un hongo en un insecto hospedador y el consecuente desarrollo de una micosis, comienzan con la adhesión de las esporas a la cutícula, la cual depende de una interacción molecular entre la superficie del conidio y la capa de cera de la misma (Boucias & Pendland, 1983). A la adhesión sobreviene la germinación de las esporas sobre esta superficie, dónde en algunos casos se produce la formación de apresorios. Una vez concluida la penetración a través de la cutícula se produce la multiplicación del patógeno en el hemocelo y, en ciertas especies fúngicas, la producción de toxinas u otros metabolitos secundarios con actividad tóxica. A esta serie de eventos sobreviene la muerte del insecto, momento en el cual el hongo coloniza todo el interior del hospedante. Por último, el micelio sale hacia el exterior atravesando el tegumento o en ciertos casos a través de los órganos de los sentidos o de los espiráculos, esporula sobre la superficie del insecto y finalmente se produce la diseminación de los propágulos

infectivos. El ciclo de vida generalizado característico de un hongo entomopatógeno (Ascomycota: Hypocreales) se esquematiza en la (Fig. 2).

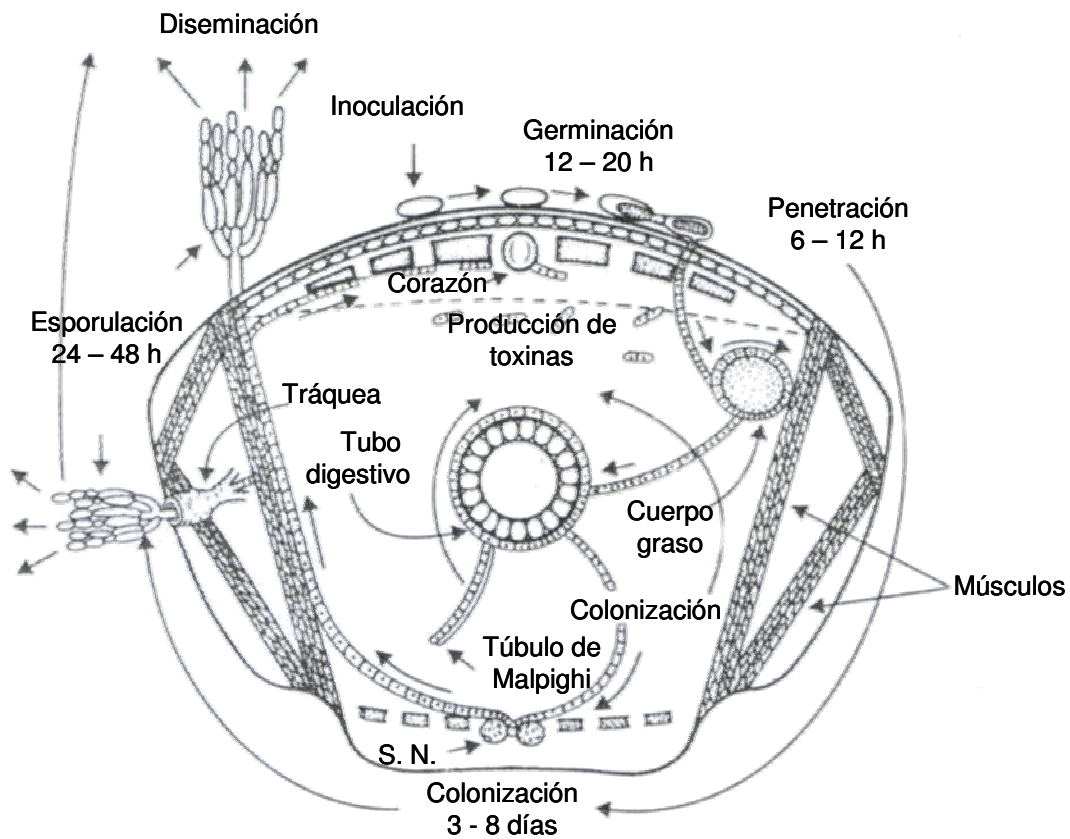


Fig. 2: Corte transversal de un insecto (Hemiptera: Cercopidae) mostrando el ciclo generalizado de un hongo entomopatógeno (*Metarhizium anisopliae*: Ascomycota: Hypocreales). Esquema modificado de Alves (1998).

Objetivos propuestos para el presente estudio

- Relevar, identificar, aislar y caracterizar hongos patógenos a partir de hemípteros Auchenorrhyncha.
- Evaluar la virulencia de una selección de aislamientos fúngicos, previamente aislados y caracterizados, contra hemípteros Auchenorrhyncha de cría experimental.
- Observar el modo de acción de los hongos entomopatógenos mediante el estudio histopatológico de Auchenorrhyncha infectados en el laboratorio, con el uso de microscopía óptica y electrónica de barrido.
- Estimar la estacionalidad y prevalencia de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha asociados a cultivos de arroz.

Hipótesis

“Las especies nativas de hongos entomopatógenos pueden ser evaluadas y utilizadas como agentes potenciales de control biológico de hemípteros auquenorrincos, plagas de la agricultura en la Argentina”.

CAPITULO II. Relevamiento, identificación, aislamiento y caracterización de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha asociados a cultivos cerealeros y malezas aledañas.

II. 1. INTRODUCCION

Un considerable número de géneros y especies fúngicas han sido aislados a partir de diversas especies de Auchenorrhyncha plaga de cultivos de arroz en el continente Asiático (Rice & Choo, 2000). En la colección de cultivos de hongos entomopatógenos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (ARSEF, USDA-ARS, Ithaca, Nueva York, USA), se registran aproximadamente 639 aislamientos fúngicos provenientes de Auchenorrhyncha de las familias Cicadellidae, Cercopidae, Cixiidae, Delphacidae y Membracidae; alrededor de 210 aislamientos provienen de América Central y del Sur, en su mayoría aportados desde Brasil. Entre las especies registradas para los Cicadellidae, Cercopidae y Membracidae de las mencionadas regiones, merecen destacarse a *Beauveria bassiana*, *Fusarium* sp., *Hirsutella* sp., *Hirsutella guyana* Minter & Brady, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *M. flavoviridae*, *Paecilomyces* sp., *P. lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota: Hypocreales), *Batkoa apiculata* (Thaxt.) Humber, *Entomophaga* sp., *E. australiensis* Humber (sp. nov., no publicada), *Mucor* sp., *Pandora delphacis* (Hori) Humber y *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko (Zygomycota: Entomophthorales) (Humber & Hansen, 2005).

Hasta el presente, un aislamiento de *M. anisopliae* proveniente de un Cicadidae de la provincia de Tucumán (Humber & Hansen, 2005) y el hallazgo de *Cordyceps sobolifera* (Berkley) Berkley & Broome (Ascomycota: Pyrenomycetes) infectando naturalmente a ninfas de *Proarna bergi* Distant (Cicadidae) representan las únicas referencias para los Auchenorrhyncha de la Argentina (López Lastra, 1989a).

El objetivo de este capítulo fue relevar, identificar, aislar y caracterizar especies nativas de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha, a fin de contribuir a ampliar el conocimiento de los enemigos naturales de estos insectos.

II.2. MATERIALES Y METODOS**II.2.1. Relevamiento e identificación de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha.**

La prospección de los insectos y de los hongos patógenos fue efectuada principalmente en cultivos cerealeros (predominantemente en maíz), así como también en la vegetación de crecimiento espontáneo aledaña a los mismos. Para tal fin se tomó como punto de referencia la Estación Experimental Julio Hirschhorn perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y

Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, situada en la localidad de Los Hornos. En dicho predio se sembraron estos cultivos de manera rotativa, lo cual permitió efectuar muestreos a lo largo de todo el año (Fig. 2). Asimismo se efectuaron muestreos ocasionales en cultivos cerealeros y malezas aledañas situados en diferentes localidades de las provincias de Corrientes, Entre Ríos y Tucumán.

Paralelamente se extendió la búsqueda a cultivos cerealeros sembrados a modo de barreras protectoras en quintas de producción hortícola orgánica. Esto a su vez amplió los sitios de prospección debido a que en algunas de estas pequeñas parcelas cultivadas se detectó la presencia de plantas de *Eryngium* sp. L. (Umbelliferae) entre los surcos, las cuales actuaron muchas veces como sitios de alimentación, reproducción y refugio de algunas especies de hemípteros Auchenorrhyncha pertenecientes a las familias Cercopidae, Cicadellidae y Membracidae (Fig. 3).



Fig. 2: Cultivos de maíz en diferente estado de desarrollo y vegetación de crecimiento espontáneo aledaña a los mismos. Estación Experimental Julio Hirschhorn, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Los Hornos.



Fig. 3: Plantas de *Eryngium* sp. asociadas a cultivos de maíz. INTA Mercedes, Corrientes.

Los muestreos fueron realizados con una frecuencia semanal en el período comprendido entre el 19 de marzo de 2003 y el 01 de diciembre de 2004.

Teniendo en cuenta las diferencias entre las plantas hospedantes a muestrear se aplicaron tres técnicas de muestreo:

- a. Recolección de insectos vivos con la utilización de redes entomológicas (entre surcos y en las inmediaciones de cultivos cerealeros). Efectuando en todas las fechas de muestreo tres muestras de 50 golpes de red cada una.
- b. Recolección de insectos vivos mediante el uso de aspiradores manuales (sobre las plantas de los cultivos cerealeros y de *Eryngium* sp.)
- c. Recolección de insectos muertos con evidentes infecciones fúngicas, mediante la utilización de pinzas entomológicas.

Además de la recolección de insectos con la finalidad de detectar este tipo de infecciones, se tomaron muestras de suelo desde algunos de los cultivos a los fines de ampliar las posibilidades de hallazgo. Con este fin, se tomaron tres muestras de aproximadamente 200g cada una en cada uno de los sitios elegidos. Las mismas fueron llevadas al laboratorio en bolsas individuales de polipropileno para luego ser procesadas.

Todos los insectos recolectados se llevaron al laboratorio dónde fueron mantenidos bajo condiciones de hacinamiento, para estimular la expresión de las infecciones fúngicas latentes que pudieran haber adquirido en el campo (Madelin, 1963; Shah *et al.*, 1997). Los insectos fueron colocados sobre hojas frescas de las plantas hospedantes provenientes de los sitios de recolección, dentro de recipientes de vidrio de 12 x 7cm, tapizados con papel de filtro humedecido y aislados con tela de voile. En estas condiciones los ejemplares fueron mantenidos en el laboratorio a una temperatura de $24 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 7 días. Se efectuaron observaciones cada 24 horas y se retiraron los cadáveres colocándolos en cámaras húmedas (cápsulas de Petri con papel de filtro humedecido), manteniéndolos en incubadora a 24°C en oscuridad para favorecer la emergencia del micelio fúngico. Los insectos muertos en estas condiciones fueron observados durante 72 horas, al término de las cuales fueron descartados aquellos que no presentaron evidencia externa de infección. Los especímenes infectados fueron mantenidos en las mismas condiciones hasta obtener un micelio abundante para posibilitar su identificación. Para la observación microscópica se montó una pequeña porción de micelio en azul de algodón (0,005 % p/v) - lactofenol de Ammann. La identificación de las especies fúngicas se realizó sobre la base de claves y monografías específicas para los distintos grupos taxonómicos (Brady, 1979a, 1979b; De Hoog, 1972; Samson, 1974; Schroers *et al.*, 1999; Schroers, 2001; Onions, 1979 y Zare & Gams, 2001). Los insectos infectados y los preparados microscópicos de las especies fúngicas fueron depositados como material de herbario de referencia en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE).

II.2.2. Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha.

Aislamiento de hongos Hypocreales a partir de los insectos hospedadores:

- a. *Aislamiento directo:* Bajo cámara de flujo laminar vertical y con el uso de alfileres entomológicos previamente esterilizados, se tomó una pequeña cantidad de micelio a partir del insecto infectado y se inoculó en cápsulas de Petri conteniendo medio de cultivo agar extracto de malta 2% (AEM 2%) (agar: 20g, dextrosa: 20g, peptona de carne: 1g, extracto de malta: 20g y agua destilada: 1lt, adaptado de Hanlin & Ulloa, 1988) + antibiótico previamente esterilizado por filtración (penicilina G 40.000 unidades/ml - Merck, Alemania y estreptomicina sulfato 80.000 unidades/ml - Parafarm®, Argentina). La cantidad de antibiótico adicionada fue de 100µl por cada 100 ml de medio de cultivo. Una

vez obtenidos los aislamientos puros, estos fueron transferidos a tubos de vidrio con medio de cultivo AEM 2% en estría para ser mantenidos a 4° C, hasta su utilización.

- b. *Aislamiento monospórico*: El insecto infectado con el hongo en etapa de esporulación fue colocado en un tubo de ensayo conteniendo 10ml de Tween 20 (polisorbato de sodio) 0,01% v/v junto con perlitas de vidrio estériles de 5mm de diámetro. El tubo fue agitado en un vórtex durante 1 minuto y a partir de la suspensión homogénea de conidios lograda, se realizaron seis diluciones seriadas (1/10). Por último se sembró 0,1 ml de la última dilución, con una concentración aproximada de 1×10^2 conidios/ml, en cápsulas de Petri de 9cm de diámetro (3 por cada aislamiento) conteniendo medio de cultivo Sabouraud dextrosa agar enriquecido con 1% de extracto de levadura (SDA-Y 1%) (agar: 20g, dextrosa: 20g, peptona: 10g, extracto de levadura: 10g y agua destilada: 1lt, adaptado de Goettel & Inglis, 1997) + antibiótico previamente esterilizado por filtración (penicilina G 40.000 unidades/ml - Merck, Alemania y estreptomycin sulfato 80.000 unidades/ml - Parafarm®, Argentina). La cantidad de antibiótico adicionada fue de 100µl por cada 100 ml de medio de cultivo. Las cápsulas fueron incubadas a $25 \pm 1^\circ$ C en oscuridad. Entre las 24 y las 48 horas de incubación se observó el desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC), las cuales fueron transferidas individualmente a tubos de vidrio con medio de cultivo AEM 2% en estría para ser mantenidas a 4° C, hasta su utilización. Esta técnica fue realizada mediante una adaptación del método citado por Lecuona (1996).

Aislamiento de hongos Hypocreales a partir de muestras de suelo:

Para realizar los aislamientos fúngicos desde el suelo se disolvió 1g de la muestra en 10 ml de agua destilada en tubos de vidrio estériles y se agitó en un vórtex durante 1 minuto. A partir de la suspensión lograda se realizaron seis diluciones seriadas (1/10). A partir de la sexta dilución se sembraron alícuotas de 0,5ml en cápsulas de Petri de 9cm de diámetro conteniendo un medio selectivo recomendado para aislar *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. (agar: 15g, glucosa: 40g, peptona: 10g, cristal violeta: 0,01g, monoacetato de dodecylguanidina (Dodine®): 0,25g, cloranfenicol: 0,5g y agua destilada: 1lt, adaptado de Doberski & Tribe, 1980). Luego de 10 a 15 días de incubación a 25° C y en oscuridad, las UFC fueron transferidas individualmente a tubos de vidrio con medio de cultivo AEM 2% en estría para ser mantenidas a 4° C, hasta su utilización.

Aislamiento de hongos Entomophthorales a partir de los insectos hospedadores:

Los hongos Entomophthorales fueron aislados de modo característico debido a la particularidad de los mismos de presentar descarga activa de conidios. Los cadáveres con desarrollo externo de micelio fueron adheridos a un trocito de cinta adhesiva de doble faz colocada en la tapa de una cápsula de Petri de 6cm de diámetro conteniendo medio de cultivo (SDA-Y 1%) + antibiótico previamente esterilizado por filtración (penicilina G 40.000 unidades/ml -

Merck, Alemania y estreptomicina sulfato 80.000 unidades/ml - Parafarm®, Argentina). La cantidad de antibiótico adicionada fue de 100µl por cada 100 ml de medio de cultivo. El insecto se mantuvo en estas condiciones durante 24 horas en cámara de cultivo a 25° C en oscuridad para dar lugar a la descarga conocida comúnmente como “lluvia de conidios” (Papierok & Hajek, 1997). Luego de este período de tiempo el insecto fue retirado junto con la cinta adhesiva, bajo cámara de flujo laminar vertical, y el aislamiento fúngico puro fue cultivado durante una semana, transferido a tubos de vidrio con medio de cultivo (SDA-Y 1%) en estría y mantenido a 4° C hasta su posterior utilización.

Caracterización de hongos entomopatógenos

La caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos se efectuó observando y registrando el aspecto y el crecimiento radial de las colonias, así como también forma, dimensiones y porcentaje de germinación de los conidios, tomando como referencia las monografías de Brady (1979a, b); De Hoog (1972); Samson (1974); Schroers *et al.* (1999); Schroers (2001); Onions (1979) y Zare & Gams (2001) y el trabajo de Rayner (1970).

A partir de cultivos puros mantenidos en cápsulas de Petri de 6cm de diámetro con medio AEM 2% durante una semana, se tomó con un ansa en anillo una porción de micelio conteniendo esporas fúngicas y se la colocó en un tubo de centrifuga Ependorff conteniendo 1ml de un tensioactivo: Tween 20 (polisorbato de sodio) 0,01% v/v. El tubo fue agitado en un vórtex durante 1 minuto y a partir de la suspensión de conidios obtenida se realizaron seis diluciones seriadas (1/10). Por último se sembraron 100µl de la última dilución, con una concentración aproximada de 1×10^2 conidios/ml., en cápsulas de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio de cultivo AEM 2% o agar papa dextrosa (APD) (agar: 20g, dextrosa: 10g, extracto de papa: 250g y agua destilada: 1lt, adaptado de Lecuona, 1996), dependiendo de la especie fúngica tratada. Las cápsulas fueron incubadas a 23, 24 ó 25° C en oscuridad, según la especie fúngica a caracterizar. Entre las 24 y las 48 horas de incubación se observó el desarrollo de las UFC, las cuales fueron transferidas individualmente a cápsulas de Petri de 6cm de diámetro con el medio de cultivo adecuado (N= 3 para cada aislamiento fúngico). Las tres réplicas se mantuvieron en las mismas condiciones que la cápsula de dónde fueron transferidas, durante un período de tiempo que de acuerdo a la especie fúngica a caracterizar varió entre 7 y 14 días. Luego de este período, la superficie del crecimiento radial de las colonias fue registrada tomando, con una regla milimetrada, dos medidas diametralmente opuestas sobre la base de la cápsula. El crecimiento radial definitivo de cada aislamiento se expresó promediando los resultados de las tres réplicas efectuadas (media \pm ES).

Los caracteres micromorfológicos fueron registrados a partir del micelio de los márgenes de las colonias realizando preparaciones en agua destilada para tomar las medidas de ancho y largo de conidios bajo microscopio óptico. Las mismas fueron registradas en tablas expresando el promedio de $N = 25 \pm ES$.

Para determinar el porcentaje de germinación de los conidios (viabilidad de los mismos) se utilizaron 3 cápsulas de Petri de 9cm de diámetro para cada aislamiento, conteniendo dos portaobjetos de vidrio y un disco de papel de filtro humedecido con agua destilada, esterilizados en autoclave tipo Chamberlain (121° C y 1 atm. de presión durante 20 minutos).

Bajo cámara de flujo laminar vertical se colocaron 100µl de AEM 2% o APD sobre uno de los dos portaobjetos contenidos en cada cápsula, utilizando una micropipeta Ependorff. El medio de cultivo fue distribuido uniformemente e inoculado con 100µl de la tercera dilución seriada (1/10), de una concentración aproximada de 1×10^4 conidios/ml., obtenida mediante el procedimiento explicado anteriormente para la siembra y obtención de UFC (Fig.4). El porcentaje de germinación se calculó contando 200 conidios tres veces para cada cápsula, luego de 24 horas de incubación a 25° C en oscuridad. Los resultados se expresaron promediando los valores obtenidos para cada réplica (media \pm ES). Esta metodología fue adaptada de Lane *et al.* (1988).

Para aquellas especies fúngicas con las que se contó con más de 10 aislamientos provenientes de diferentes insectos hospedadores, se realizaron estudios de correlación lineal ($\alpha = 0.10$), análisis de la varianza (ANOVA) y test de Fisher de diferencias mínimas significativas (LSD) ($\alpha = 0.05$) a fines de detectar la existencia de alguna correlación entre parámetros tales como diámetro de colonias, tamaño de conidios y viabilidad de los mismos, o evidenciar diferencias significativas entre aislamientos provenientes de diferente especie de insecto hospedador o de la misma especie de insecto recolectada en diferentes localidades. Para efectuar las correlaciones tanto para el diámetro de las colonias como para el tamaño de los conidios se utilizaron índices resultantes de dividir los dos diámetros registrados para el crecimiento radial de las colonias y el largo / ancho para los conidios. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico STSC, Statgraphics (1987).

Todos los aislamientos fúngicos obtenidos fueron depositados en la colección micológica del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, La Plata, Buenos Aires, Argentina). Algunos aislamientos fueron depositados en el Cepario de Levaduras y Hongos Filamentosos del Instituto de Botánica "Carlos Spegazzini" (LPSC, La Plata, Buenos Aires, Argentina), en la colección de cultivos de hongos entomopatógenos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (ARSEF, USDA-ARS, Ithaca, Nueva York, USA) y en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda).

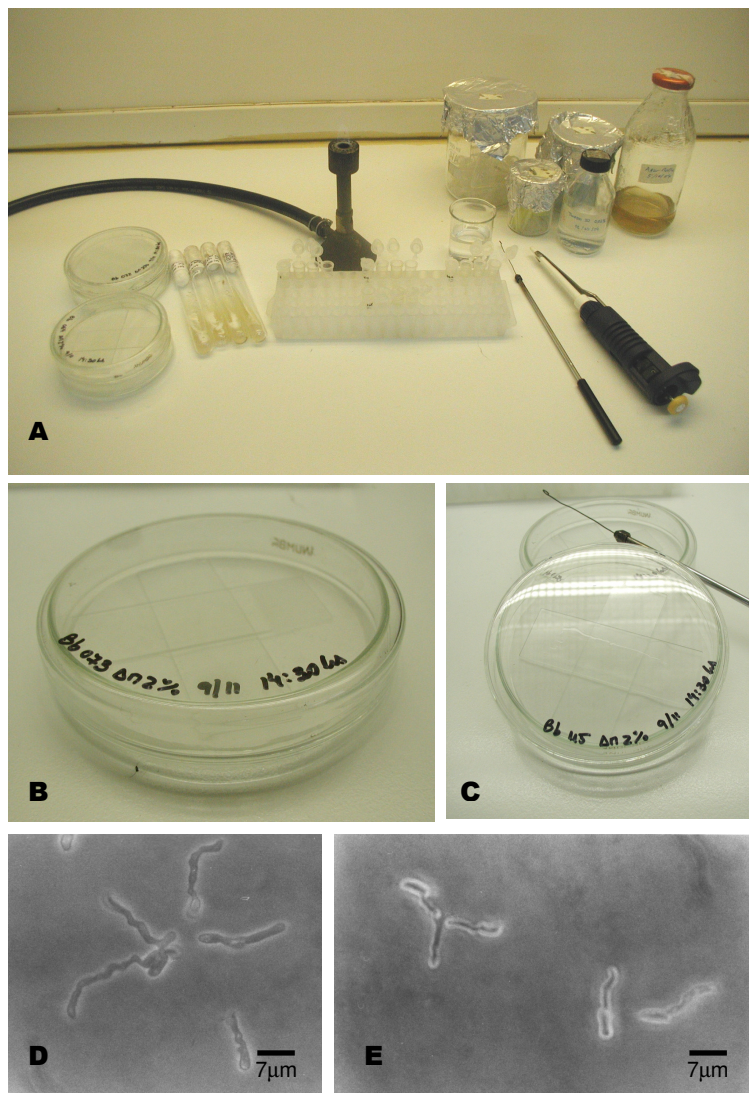


Fig. 4: **A:** Materiales de laboratorio utilizados para la estimación del porcentaje de germinación de los conidios fúngicos. **B-C:** Cápsulas de Petri de 9cm de diámetro preparadas para la siembra del medio de cultivo y la suspensión de conidios. **D-E:** Observación de la germinación de conidios de *M. anisopliae* bajo microscopio óptico equipado con contraste de fases.

II.3. RESULTADOS Y DISCUSION

II.3.1. Relevamiento e identificación de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha.

Relevamiento de especies fúngicas a partir de insectos

Lugar de muestreo: Estación Experimental Julio Hirschhorn, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Los Hornos, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 52' S. Long.: 57° 58' O.

01/12/04	05/02/04	21/11/03	02/09/03	03/07/03	12/06/03	05/06/03	02/04/03	19/03/03	Fecha	Substrato
Cynodon dactylon L., aledaño a cultivos de maíz										
Insectos recolectados										
0	0	0	0	0	0	0	1	1		Cercopidae
88	82	13	30	13	72	12	90	10		Cicadellidae
3	0	0	0	0	0	0	0	0		Cixiidae
55	3	2	1	6	12	2	5	0		Delphacidae
0	3	0	0	0	0	0	0	0		Flatidae
0	0	0	0	0	0	0	4	1		Membracidae
39	0	0	33	0	0	0	0	0		Sternorrhyncha
152	20	2	2	10	2	5	0	6		Heteroptera
148	9	2	4	3	4	6	6	8		Hymenoptera
48	11	3	2	3	1	2	4	2		Coleoptera
189	18	3	4	11	17	12	10	6		Diptera
4	0	0	1	3	3	4	0	0		Araneae
3	0	0	0	0	1	0	0	0		Lepidoptera
1	2	3	0	0	0	0	0	0		Orthoptera
78	0	0	0	0	0	0	0	0		Collembola
13	0	0	0	0	0	0	0	0		Thysanoptera
0	0	0	0	0	0	0	0	0		Insectos infectados
-	-	-	-	-	-	-	-	-		Especie fúngica
26	26	35	23	23	18	20	.	.		Tº
57	49	29	46	65	57	50	.	.		HR

Lugar de muestreo: Horco Molle, Tucumán, Argentina. Lat.: 26° 47' 33,4'' S. Long.: 65° 19' 05,3'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	T°	HR
		Auchenorrhyncha Cicadellidae	Coleoptera				
21/03/03	<i>Lantana camara</i> L.	2	0	<i>Oncometopia tucumana</i> (Cicadellidae) (2♀)	<i>Clonostachys rosea</i>	-	-
28/03/03	<i>L. camara</i>	2	0	<i>O. tucumana</i> (2♀)	<i>C. rosea</i>	-	-
09/03/04	<i>Eryngium</i> sp.	0	1	Sp. no identificada	<i>Beauveria bassiana</i>	-	-
14/04/04	<i>L. camara</i>	1	0	<i>O. tucumana</i> (1♀)	<i>C. rosea</i>	-	-

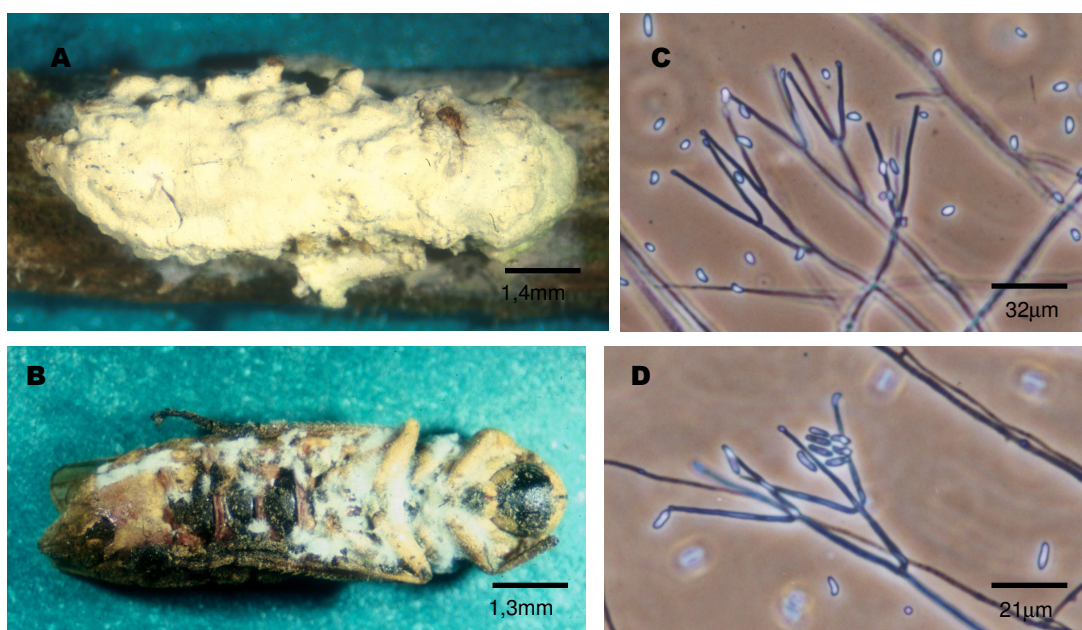


Fig. 5: A-B: Hembras de *Oncometopia tucumana* Schröder infectadas con *Clonostachys rosea* (Link: Fries) Schroers, Samuels, Seifert & Gams. **C-D:** Fiálides y conidios de conidióforos primarios de *C. rosea* montados en azul de algodón - lactofenol de Ammann.

Lugar de muestreo: Campo próximo a Ruta 58. San Vicente, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 35° 0,1' 59,9'' S. Long.: 58° 27' 15,0'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	T°	HR
		Auchenorrhyncha Cicadellidae	Coleoptera Curculionidae				
13/07/03	<i>Eryngium</i> sp.	30	1	Curculionidae (1 adulto). Sp no identificada.	<i>Beauveria</i> sp.	-	-
09/05/04		2	0	<i>Balacha melanocephala</i> (Cicadellidae) (2♀)	<i>B. bassiana</i>	20	60

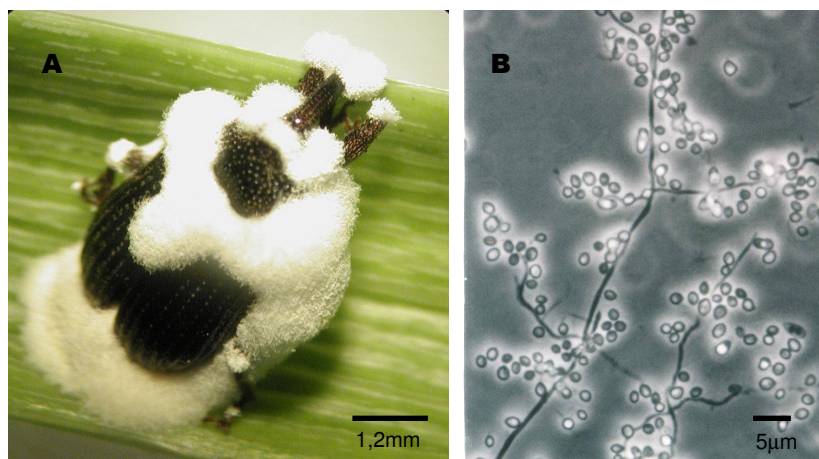


Fig. 6: **A:** Coleoptera: Curculionidae adulto recolectado en plantas de *Eryngium* sp. e infectado con *B. bassiana*. **B:** Conidióforos, fiálides y conidios de *B. bassiana* montados en azul de algodón - lactofenol de Ammann.

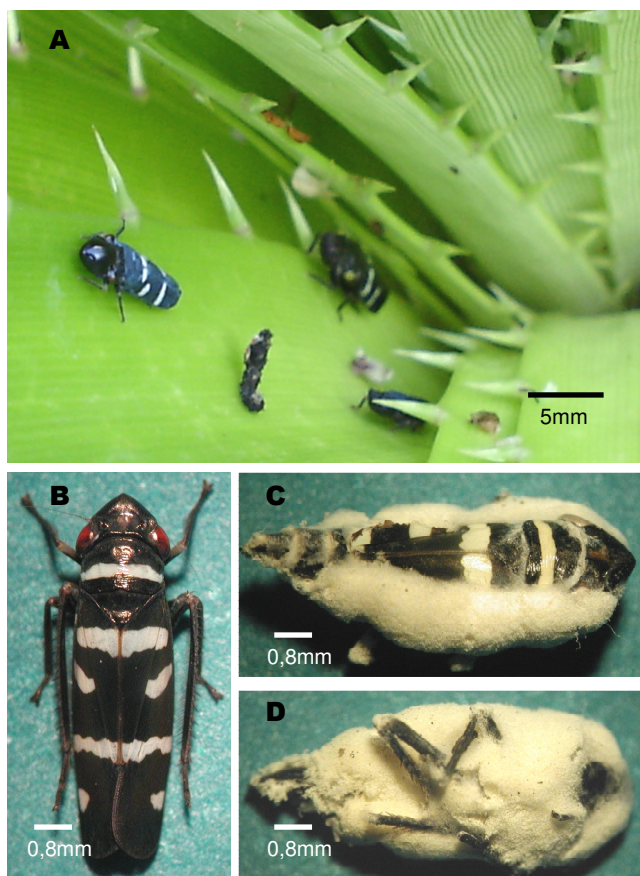


Fig. 7: **A:** Adultos de *Balacha melanocephala* Signoret dispuestos entre las hojas de *Eryngium* sp. **B:** Detalle de una hembra sana. **C-D:** Vista dorsal y ventral de una hembra infectada con *B. bassiana*.

Lugar de muestreo: Parque “San Francisco”, San Vicente, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 35° 0,1' 49,5'' S. Long.: 58° 26 '56,9'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha					
		Cicadellidae	Membracidae				
19/07/03	Eryngium sp.	30	0	0	-	-	-
09/08/03		30	0	0	-	22	55
24/08/03		30	0	0	-	15	50
28/12/03		30	0	0	-	28	30
20/03/04		5	9	B. melanocephala (Cicadellidae) (3♂, 1♀ y 1 sin genitalia) y Kronides sp. (Membracidae) (1♂ y 1♀ y 2 ninfas)	B. bassiana	24	43
09/05/04		2	0	B. melanocephala (2♀)	B. bassiana	21	65

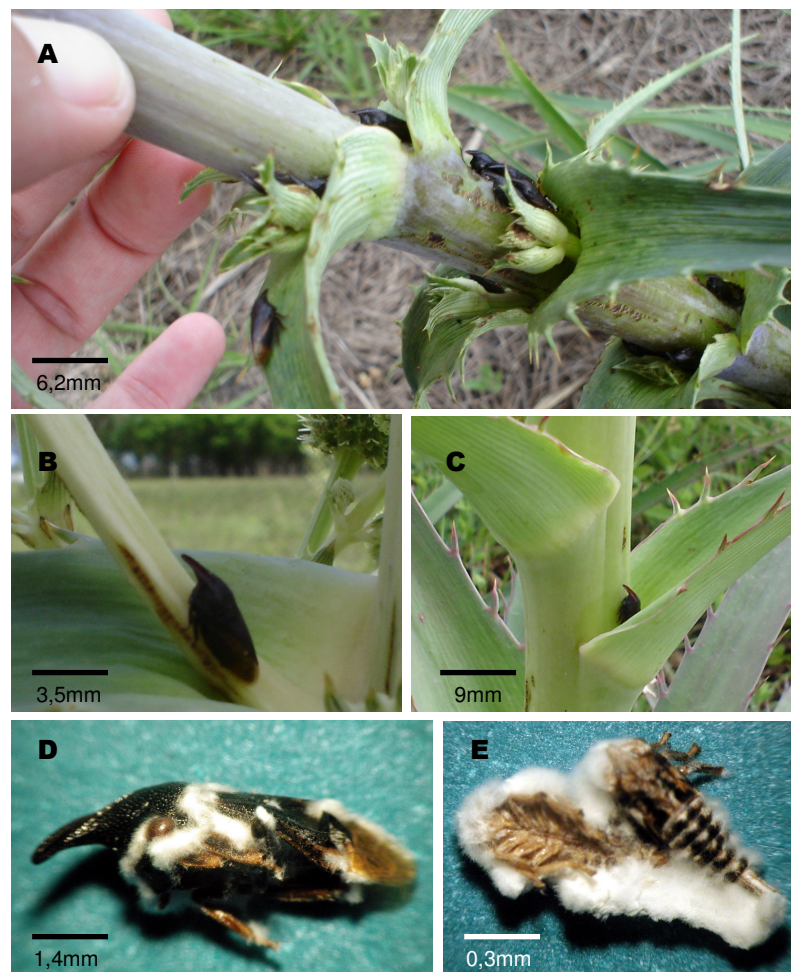


Fig. 8: A-C: Adultos de *Kronides* sp. dispuestos entre las brácteas de los tallos de *Eryngium* sp. D: Adulto de *Kronides* sp. infectado con *B. bassiana*. E: Ninfas de *Kronides* sp. infectadas con *B. bassiana*.

Lugar de muestreo: Colonia Urquiza, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 56' 19,2'' S. Long.: 58° 0,6' 3,8'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados							Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha			Heteroptera	Hymenoptera	Coleoptera	Diptera				
		Cicadellidae	Delphacidae	Flatidae								
20/08/03	<i>Eryngium</i> sp.	30	0	0	0	0	0	0	-	-	19	63
11/09/03	<i>Eryngium</i> sp.	30	0	0	0	0	0	0	<i>B. melanocephala</i> (1♂2♀)	<i>B. bassiana</i>	22	35
	<i>C. dactylon</i>	0	10	0	0	0	0	0	0	-		
17/09/03	<i>Eryngium</i> sp.	30	0	0	0	0	0	0	<i>B. melanocephala</i> (1ninf)	<i>B. bassiana</i>	-	-
09/12/03	<i>Eryngium</i> sp.	30	0	0	0	0	0	0	<i>B. melanocephala</i> (1♂ y 1 sin genitalia)	<i>B. bassiana</i>	31	27
10/02/04	<i>C. dactylon</i> aledaño a maíz	30	2	1	16	3	1	13	0	-	30	50
	<i>Eryngium</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	<i>B. melanocephala</i> (1♂ y 1 sin genitalia)	<i>B. bassiana</i>		

Lugar de muestreo: Ruta 39, Punta Lara, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 51' 33'' S. Long.: 57° 52' 23'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados	Insectos infectados	Especie fúngica	T°	HR
		Auchenorrhyncha				
		Cicadellidae				
26/04/04	<i>Eryngium</i> sp.	30	0	-	-	-
22/09/04		30	0	-	25	52

Lugar de muestreo: Parque Nacional "El Palmar", Colón, Entre Ríos, Argentina. Lat.: 31° 51' 15,1'' S. Long.: 58° 19' 23,5'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados	Insectos infectados	Especie fúngica	T°	HR
		Auchenorrhyncha				
		Cicadellidae				
27/09/03	<i>Eryngium</i> sp.	2	<i>Sonesimia grossa</i> (2♀)	<i>C. rosea</i>	-	-

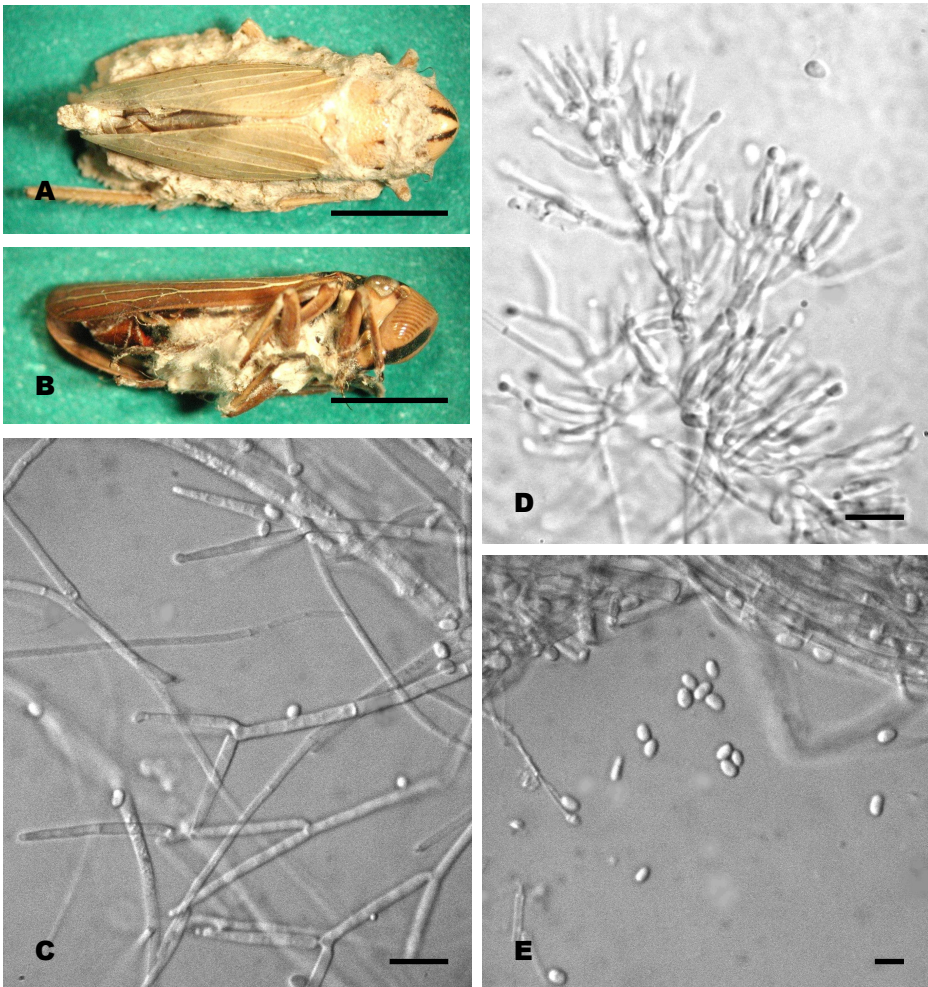


Fig. 9: **A-B:** Hembras de *Sonesimia grossa* (Signoret) infectadas con *C. rosea*. Escala: 3mm. **C:** Conidióforos primarios, fiálides y conidios. Escala: 15µm. **D:** Conidióforos secundarios, fiálides y conidios. Escala: 11µm. **E:** Conidios. Escala: 10µm.

Lugar de muestreo: “Solar de La Paz”, San Vicente, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 35° 0,1’ 35,3’’ S. Long.: 58° 26’ 13,1’’ O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados	Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha				
		Cicadellidae				
05/10/03	<i>Eryngium</i> sp.	3	<i>B. melanocephala</i> (2♀ y 1 sin genitalia)	<i>B. bassiana</i>	-	-

Lugar de muestreo: Escuela Agraria “General Lucio Mansilla”, Gral. Mansilla, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 35° 05' 30,2'' S. Long.: 57° 45' 21,2'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados							Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Aucheno - rrhyncha	Heteroptera	Hymenoptera	Coleoptera	Orthoptera	Diptera	Araneae				
04/11/03	Medicago sativa L. “alfalfa”	9	4	1	14	2	58	1	Diptera (1 adulto). Sp no identificada	B. bassiana	33	46

Lugar de muestreo: Campo 189, Arana, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 35° 0' 19,8'' S. Long.: 57° 55' 30'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados										Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Aucheno-rrhyncha		Sternorrhyncha	Heteroptera	Hymenoptera	Coleoptera	Orthoptera	Diptera	Dermaptera	Lepidoptera				
		Cicadellidae	Delphacidae												
29/10/03	<i>C. dactylon</i> aledaño a maíz	4	0	0	0	1	8	1	7	0	0	0	-	26	48
15/12/04	<i>C. dactylon</i> aledaño a maíz	35	11	2	17	15	0	1	106	0	2	0	-	25	70
	<i>Zea mayz</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<i>Doru lineare</i> (Dermaptera: Forficulidae) (1♀)	<i>Hirsutella</i> sp.		
05/01/05	<i>Zea mayz</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	<i>D. lineare</i>	-	27	71

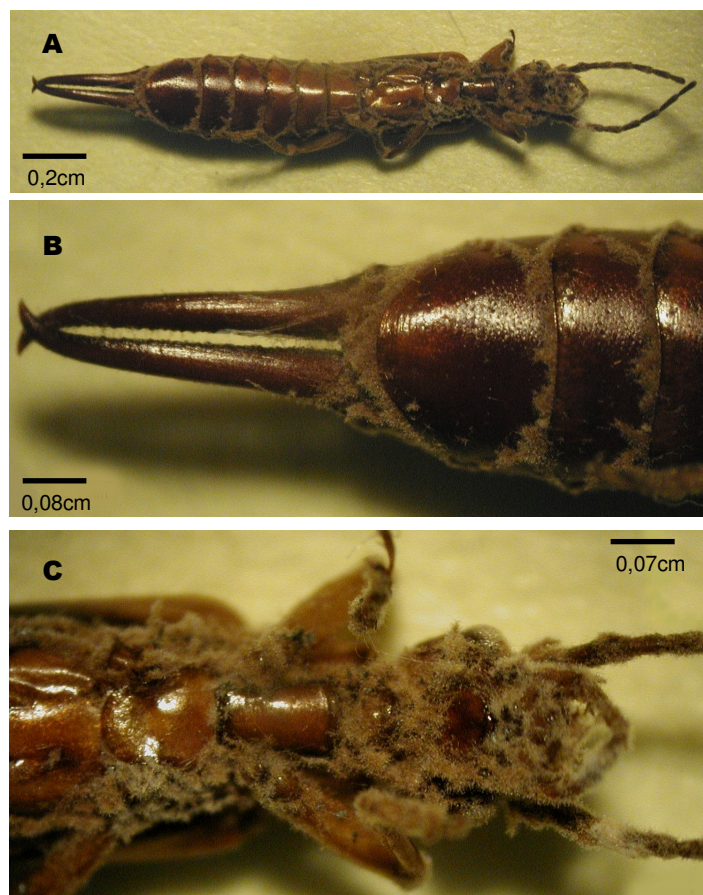


Fig. 10: **A:** Adulto de *Doru lineare* (Eschscholtz) infectado con *Hirsutella* sp. **B:** Detalle del extremo abdominal de *D. lineare* infectado con *Hirsutella* sp. **C:** Detalle de cabeza y tórax de *D. lineare* infectado con *Hirsutella* sp.

Lugar de muestreo: Quinta hortícola orgánica en Parque Pereyra Iraola, Berazategui, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 57' 55,4'' S. Long.: 57° 52' 58,6'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados								Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha		Heteroptera	Coleoptera	Orthoptera	Diptera	Neuroptera	Araneae				
		Cicadellidae	Membracidae										
17/12/03	C. dactylon aledaño a maíz	6	1	32	12	1	127	1	2	0	-	29	36

Lugar de muestreo: Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS), Berazategui, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 51' S. Long.: 58° 06' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	T°	HR
		Auchenorrhyncha Cicadellidae	Coleoptera				
30/12/03	Eryngium sp.	31	1	<i>B. melanocephala</i> (Cicadellidae) (1♀) y sp. no identificada de Coleoptera: Curculionidae (1 adulto)	<i>B. bassiana</i>	30	45
20/04/04		4	0	<i>B. melanocephala</i> (1♂ y 3♀)	<i>B. bassiana</i>	18	49
21/07/04		1	3	<i>B. melanocephala</i> (1♀) y 3 Curculio – nidae adultos. Sp. no identificada.	<i>B. bassiana</i>	17	64
25/08/04		5	1	<i>B. melanocephala</i> (2♀), <i>Pawiloma victima</i> (3♂) (Cicadellidae) y Coleoptera. Sp. no identificada (1 adulto)	<i>B. bassiana</i>	26	40



Fig. 11: Adulto de *Pawiloma victima* (Germar) infectado con *B. bassiana*.

Lugar de muestreo: Calle 137 y 89, Los Hornos, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 57' 29,5'' S. Long.: 58° 5' 26,6'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	T°	HR
		Auchenorrhyncha Cicadellidae	Cercopidae				
24/02/04	Eryngium sp.	1	1	<i>B. melanocephala</i> (Cicadellidae) (1♀) <i>Kanaima fluvialis</i> (Cercopidae) (1♂)	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	30	45
30/03/04		1	2	<i>B. melanocephala</i> (1♀) <i>K. fluvialis</i> (Cercopidae) (2♂)	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i>	29	73
30/06/04		20	2	0	-	13	68

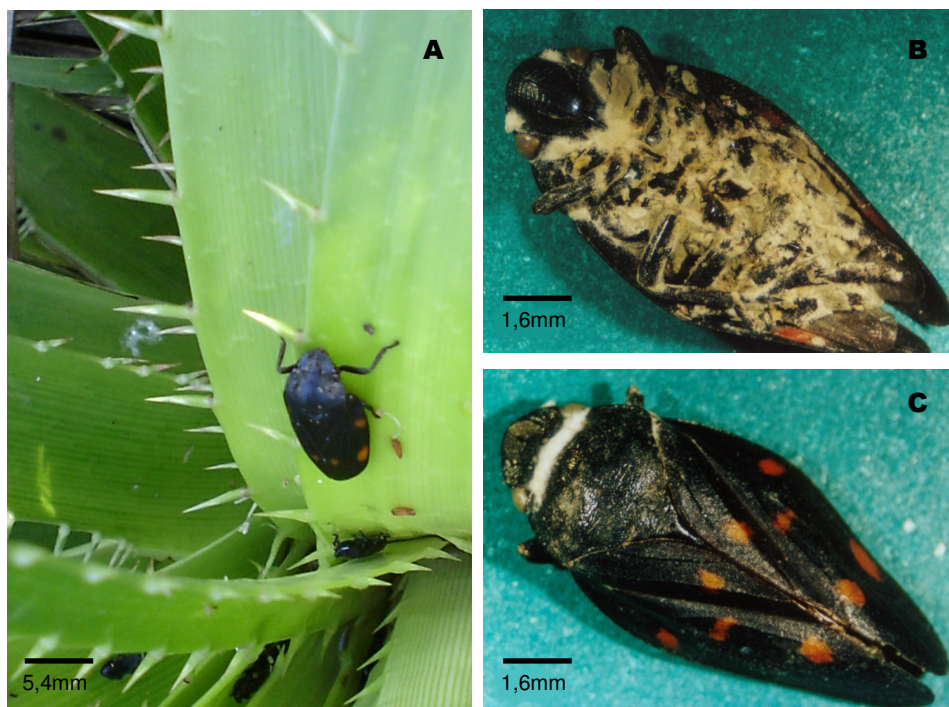


Fig. 12: **A:** Adulto sano de *Kanaïma fluvialis* (Lallemand) dispuesto entre las hojas de *Eryngium* sp. **B:** Vista ventral y **C:** Vista dorsal de un adulto infectado con *M. anisopliae*.

Lugar de muestreo: Arroyo “Cañada Honda”. Ruta 9 Km. 113, San Antonio de Areco, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 10' 27" S. Long.: 58° 59' 17,7" O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados	Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Coleoptera				
03/03/04	<i>Eryngium</i> sp.	1	<i>Chauliognathus scriptus</i> (Cantharidae) (1adulto)	<i>M. anisopliae</i>	-	-

Lugar de muestreo: Arroyo “La Cruz”, Ruta 9 Km. 75, San Antonio de Areco, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 10' 27" S. Long.: 58° 59' 17,7" O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados	Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha Cercopidae				
03/03/04	<i>Eryngium</i> sp.	5	Sp. no identificada (Cercopidae) (3♂ y 2♀)	<i>M. anisopliae</i>	-	-

Lugar de muestreo: El Manantial, Tucumán, Argentina. Lat.: 26° 49' 50,2" S. Long.: 65° 16' 59,4" O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados			Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Coleoptera		Dermaptera				
		Coccinellidae	Chrysomelidae	Forficulidae				
11/03/04	Zea mayz	3	1	1	<i>Diabrotica speciosa</i> (Chrysomelidae) (1 adulto) <i>Cycloneda sanguinea</i> (Coccinellidae) (3 adultos) <i>Doru lineare</i> (Forficulidae) (1 adulto)	<i>B. bassiana</i>	-	-
15/04/04		0	0	1	<i>D. lineare</i> (1 adulto)	<i>B. bassiana</i>	-	-

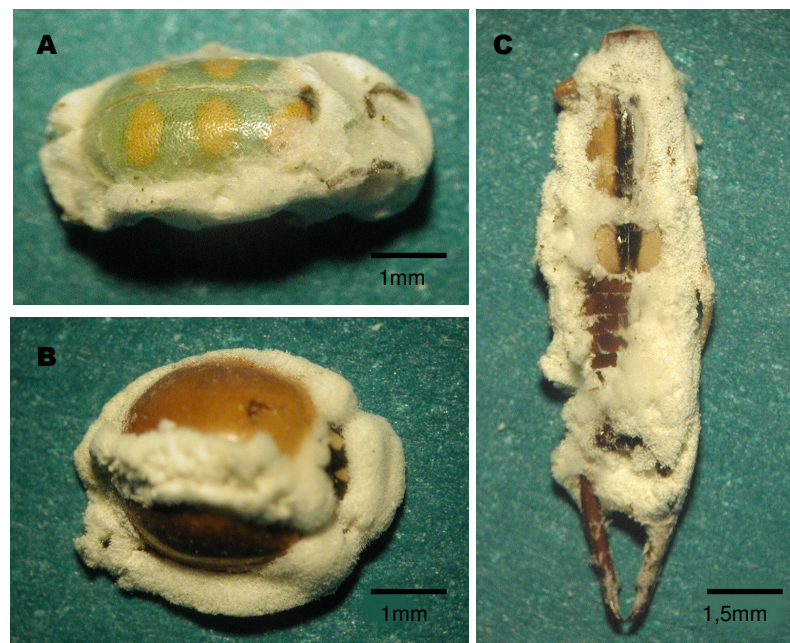


Fig. 13: **A:** Adulto de *Diabrotica speciosa* (Germar), **B:** Adulto de *Cycloneda sanguinea* L. y **C:** Adulto de *Doru lineare* infectados con *B. bassiana*.

Lugar de muestreo: Ruta 36 y 511, Abasto, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 57' 59" S. Long.: 58° 04' 42" O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados			Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha Cercopidae	Heteroptera Pentatomidae	Coleoptera Curculionidae				
07/04/04	<i>Eryngium</i> sp.	9	2	1	Sp. no identificada (Cercopidae) (7♂ y 1 sin genitalia) Sp. no identificada (Pentatomidae) (1 ninfa) <i>Euchistus</i> sp. (Pentatomidae) (1 adulto) Sp. no identificada (Curculionidae) (1 adulto)	<i>M. anisopliae</i> <i>M. anisopliae</i> <i>B. bassiana</i> <i>B. bassiana</i>	26	72
13/04/04		5	0	2	Sp. no identificada (Cercopidae) (4♂ y 1 sin genitalia) Sp. no identificada (Curculionidae) (2 adultos)	<i>M. anisopliae</i> <i>B. bassiana</i>	34	48
28/04/04		7	0	9	Sp. no identificada (Cercopidae) (5♂ y 2♀) Sp. no identificada (Curculionidae) (9 adultos)	<i>M. anisopliae</i> <i>B. bassiana</i>	23	64
12/05/04		2	0	13	<i>Kanaima fluvialis</i> (Cercopidae) (1♂ y 1♀) Sp. no identificada (Curculionidae) (13 adultos)	<i>M. anisopliae</i> <i>B. bassiana</i>	19	64
18/05/04		3	0	0	Sp. no identificada (Cercopidae) (2♂ y 1♀)	<i>M. anisopliae</i>	16	43
01/06/04		3	0	0	Sp. no identificada (Cercopidae) (2♂ y 1♀)	<i>M. anisopliae</i>	17	65
09/06/04		0	0	6	Sp. no identificada (Curculionidae) (6 adultos)	<i>B. bassiana</i>	16	84
22/06/04		0	0	5	Sp. no identificada (Curculionidae) (5 adultos)	<i>B. bassiana</i>	15	67

Lugar de muestreo: Ruta 36 (Escuela N° 70), Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 58' 43,3" S. Long.: 58° 03' 39,1" O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha					
		Cicadellidae	Cercopidae				
18/05/04	Eryngium sp.	1	3	Sp. no identificada (Cercopidae) (1♂ y 2♀) B. melanocephala (Cicadellidae) (1♀)	M. anisopliae	16	43

Lugar de muestreo: Arroyo “El Pescado”, Ruta 11, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 35° 01' 27,6'' S. Long.: 57° 51' 26,0'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha Cicadellidae	Coleoptera Curculionidae				
09/08/04	<i>Eryngium</i> sp.	5	0	0	-	22	34
18/08/04		1	2	<i>B. melanocephala</i> (Cicadellidae) (1 adulto sin genitalia) <i>Heilipodus erythropus</i> (1 adulto) y sp. no identificada (1 adulto) (Curculionidae)	<i>B. bassiana</i>	-	-
06/10/04		0	1	Sp. no identificada (1 adulto) (Curculionidae)	<i>B. bassiana</i>	29	39

Lugar de muestreo: Ruta 11 Km. 11, Buenos Aires, Argentina. Lat.: 34° 57,32' S. Long.: 57° 49,47' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha Cicadellidae					
18/08/04	<i>Eryngium</i> sp.	2		<i>B. melanocephala</i> (1♀ y 1 ♂)	<i>B. bassiana</i>	12	68

Lugar de muestreo: Esteros del Iberá, Corrientes, Argentina. Lat.: 28° 24' S. Long.: 57° 07' O

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha Cercopidae					
06/10/04	<i>Eryngium</i> sp.	7		Sp. no identificada (Cercopidae) (1♂, 5♀ y 1 ninfa)	<i>M. anisopliae</i>	-	-

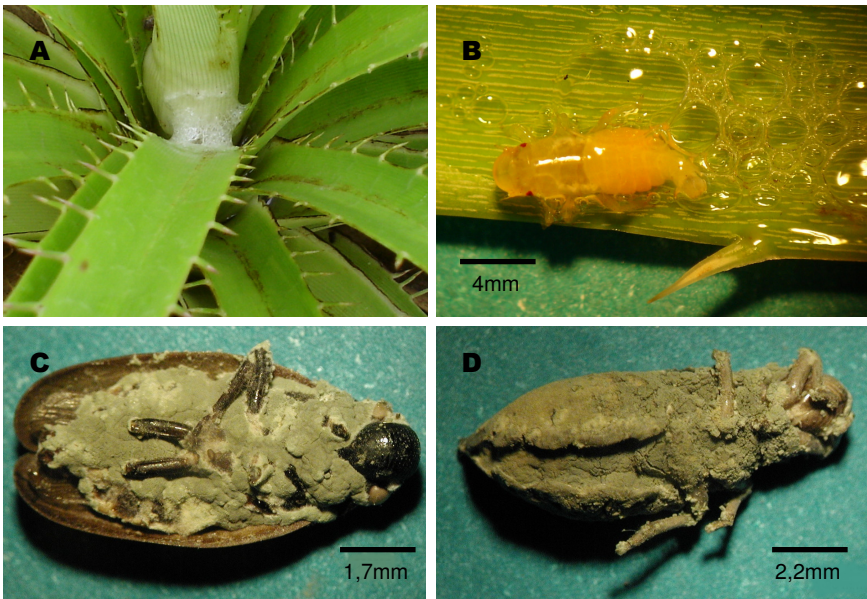


Fig. 14: **A:** Espuma conformada por savia y secreciones albuminoideas viscosas, que expelen las ninfas de Cercopidae a través del ano. **B:** Ninfa de Cercopidae agitando el extremo abdominal para airear sus secreciones. **C:** Adulto de Cercopidae infectado con *M. anisopliae*. **D:** Ninfa de Cercopidae infectada con *M. anisopliae*.

Lugar de muestreo: Estación Experimental “Colonia 3 de abril”: INTA Bella Vista, Corrientes, Argentina. Lat.: 28° 26’ 58,1’’ S. Long.: 58° 55’ 38’’ O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados	Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha Cercopidae				
10/11/04	<i>Eryngium</i> sp.	4	<i>Kanaima fluvialis</i> (Cercopidae) (2♂, 2♀)	<i>M. anisopliae</i>	29	52

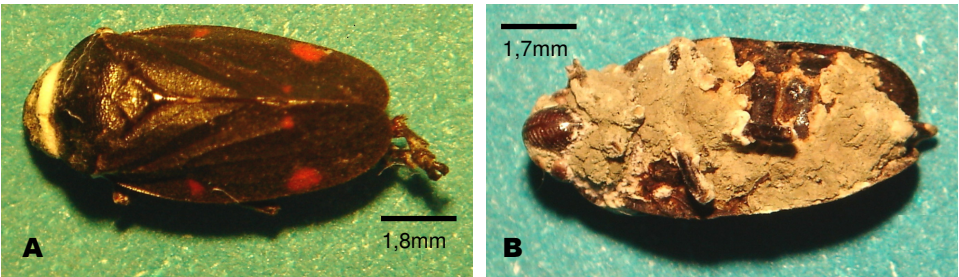


Fig. 15: **A:** Vista dorsal y **B:** Vista ventral de adulto de *Kanaima fluvialis* infectado con *M. anisopliae*.

Lugar de muestreo: INTA Mercedes, Corrientes, Argentina. Lat.: 29° 11' 43,5'' S. Long.: 58° 02' 0,8'' O.

Fecha	Substrato	Insectos recolectados		Insectos infectados	Especie fúngica	Tº	HR
		Auchenorrhyncha Membracidae	Coleoptera Lampyridae				
15/11/04	<i>Eryngium</i> sp.	1	2	<i>Kronides</i> sp. (Membracidae) (1♀) <i>Cratomorphus diaphanus</i> (Lampyridae) (2 adultos)	<i>B. bassiana</i>	29	66

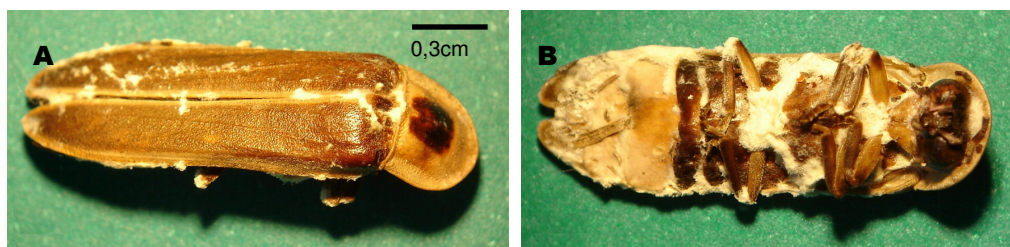


Fig. 17: **A:** Vista dorsal y **B:** Vista ventral de adulto de *Cratomorphus diaphanus* (Germar) infectado con *B. bassiana*.

Además de los hongos entomopatógenos relevados en los cultivos cerealeros, se detectaron e identificaron otros tantos en diferentes insectos hospedadores encontrados en diversos substratos:

- *Erynia dipterigena* (Thaxter) Remaudiere & Hennebert (Zygomycota: Entomophthorales), Aislado a partir de un díptero adulto de la familia Sciaridae, recolectado en cultivos experimentales de *Vitis vinifera* L., “vid”, Estación Experimental Julio Hirschhorn, Los Hornos, Buenos Aires. Lat.: 34° 52' S. Long.: 57° 58' O (Fig. 17 A).

- *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko (Zygomycota: Entomophthorales). Aislado a partir de una hembra de *Delphacodes haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae) criada sobre *Hordeum vulgare* L., “cebada forrajera” en invernáculo, La Plata, Buenos Aires. Lat.: 35° 54' 18,2'' S. Long.: 57° 57' 0,3'' O (Fig. 17B).

- *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko (Zygomycota: Entomophthorales). Observado infectando naturalmente a una hembra de *Empoasca* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) en *Lactuca sativa* L.,

“lechuga” cultivada en invernáculo en la localidad de Olmos, La Plata, Buenos Aires. Lat.: 35° 01′ 11,5″ S. Long.: 58° 02′ 17,1″ O. (Fig. 17 C).

- *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Detectado infectando naturalmente a adultos de *Plagioder erythroptera* Blanchard (Coleoptera: Chrysomelidae), recolectados en la corteza de *Salix babylonica* L., “sauce llorón”, San Vicente, Buenos Aires. Lat.: 35° 0,1′ 17,3″ S. Long: 58° 25′ 21,4″ O (Fig. 17 D).

- *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Ascomycota: Hypocreales). Aislado a partir de la cera genital de una hembra de *Oliarus dimidiatus* Berg (Hemiptera: Cixiidae), recolectada en gramíneas no identificadas (pastura natural) en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. La Plata, Buenos Aires. Lat.: 34° 54′ 35,97″ S. Long.: 57° 55′ 41,57″ O. (Fig.17 E).

- *Fusarium* sp. (Ascomycota: Hypocreales). Aislado a partir de un adulto de *Dichelops furcatus* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), recolectado sobre gramíneas no identificadas (pastura natural) en la localidad de Los Pereyra, Santiago del Estero.

- *Fusarium* sp. Aislado de un macho de *D. kuscheli*, criado sobre “cebada forrajera” en invernáculo, La Plata, Buenos Aires. Lat.: 35° 0,1′ 17,3″ S. Long: 58° 25′ 21,4″ O.

- *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams (Ascomycota: Hypocreales). Aislado de una hembra de *Delphacodes kuscheli* Fennah (Hemiptera: Delphacidae) criada sobre “cebada forrajera” en invernáculo, La Plata, Buenos Aires. Lat.: 35° 0,1′ 17,3″ S. Long: 58° 25′ 21,4″ O.

- *Aphanocladium* sp. (Ascomycota: Hypocreales). Aislado a partir de hembras y machos de *D. kuscheli*, criados sobre “cebada forrajera” en el invernáculo del CEPAVE, La Plata, Buenos Aires. Lat.: 35° 0,1′ 17,3″ S. Long: 58° 25′ 21,4″ O.

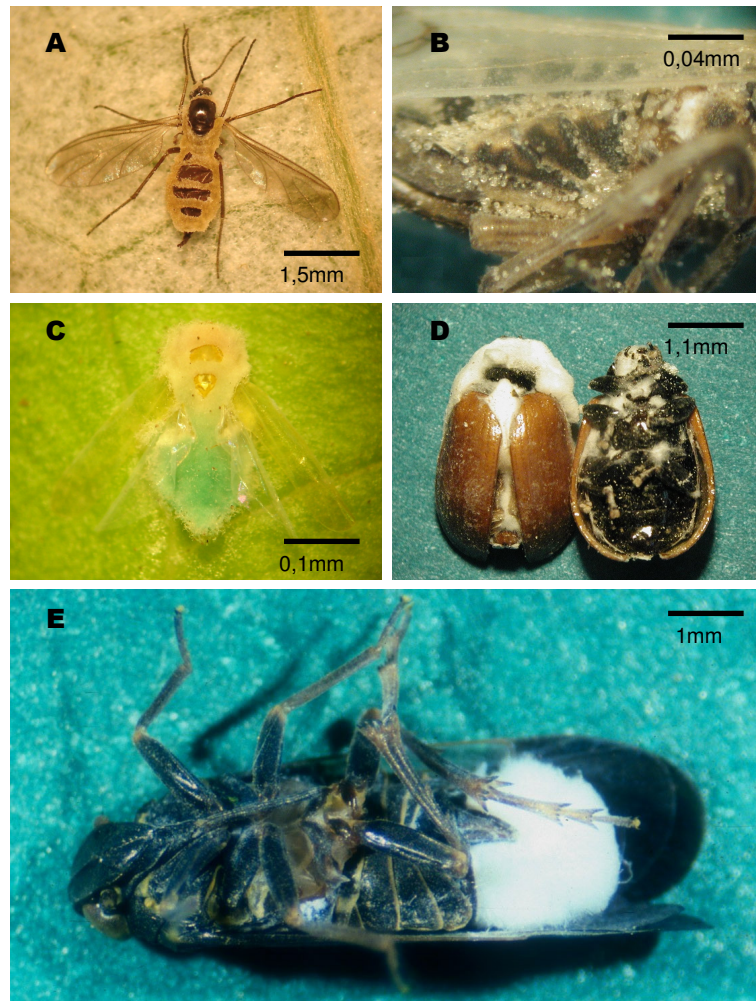


Fig. 17: **A:** Diptera: Sciaridae infectado naturalmente con *Erynia dipterigena*. **B:** Detalle del abdomen de una hembra de *Delphacodes haywardi* mostrando la infección con *Conidiobolus coronatus*. Se observa la presencia de los conidióforos y conidios que dan a la superficie del cuerpo del hospedador un aspecto azucarado. **C:** Hembra de *Empoasca* sp. infectada con *Zoophthora radicans*. **D:** Adultos de *Plagioder erythroptera* en vista dorsal y ventral, mostrando la infección con *Beauveria bassiana*. **E:** Hembra de *Oliarus dimidiatus* en vista ventral mostrando la cera genital a partir de donde fue aislado *Paecilomyces fumosoroseus*.

Relevamiento de especies fúngicas a partir de muestras de suelo

Fecha	Lugar de muestreo	Substrato	Especie fúngica	T°	HR
30/05/03	Campo "Las Madreselvas". Ruta 36 Km. 101, Magdalena, Buenos Aires, Argentina.	Suelo de cultivos de <i>Zea mayz</i>	<i>B. bassiana</i>	23	61
03/07/03	Estación Experimental Julio Hirschhorn, Los Hornos, Buenos Aires, Argentina.		<i>Paecilomyces farinosus</i> <i>B. bassiana</i>	23	65
13/07/03	Campo próximo a Ruta 58, San Vicente, Buenos Aires, Argentina.	Suelo de cultivos de <i>Sorghum vulgare</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Fusarium</i> sp.	-	-

II.3.2. Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de hemípteros Auchenorrhyncha.

A partir de los insectos recolectados en el campo y de los procedentes de la colonia del CEPAVE, como así también de las muestras de suelo, se lograron obtener 92 aislamientos puros de hongos entomopatógenos. En la Tabla 1 se presentan los datos de las especies fúngicas, el hospedador o sustrato del que fueron aisladas, el sitio y fecha de muestreo, así como sus números de acceso a las distintas colecciones micológicas donde fueron depositadas.

Espece fúngica	Hospedador / sustrato	Sitio y fecha de muestreo	Nro. CEPAVE	Nro. LPSC	Nro. ARSEF
<i>Aphanocladium</i> sp.	<i>D. kuscheli</i> (HD)	Invernáculo CEPAVE, La Plata, 06/06/05	200	879	-
<i>Aphanocladium</i> sp.	<i>D. kuscheli</i> (HD)	Invernáculo CEPAVE, La Plata, 06/06/05	201	880	-
<i>Beauveria</i> sp.	Sp. no identificada (CCur)	San Vicente, 13/07/03	061	-	7463
<i>Beauveria bassiana</i>	Suelo	Magdalena, 30/05/03	001	881	-
<i>B. bassiana</i>	Suelo	Los Hornos, 03/07/03	002	882	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	Colonia Urquiza, 11/09/03	072	781	7464
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	C. Urquiza, 9/12/03	069	883	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	C. Urquiza, 9/12/03	073	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 30/12/03	074	884	7465
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	ECAS, Berazategui, 30/12/03	075	-	7466
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	C. Urquiza, 10/02/04	070	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	Los Hornos, 24/02/04	077	885	7467
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (C)	Horco Molle, Tucumán, 09/03/04	083	-	7470
<i>B. bassiana</i>	<i>Cycloneda sanguinea</i> (CCoc)	El Manantial, Tucumán, 11/03/04	147	896	-
<i>B. bassiana</i>	<i>C. sanguinea</i> (CCoc)	El Manantial, Tucumán, 11/03/04	148	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>C. sanguinea</i> (CCoc)	El Manantial, Tucumán, 11/03/04	149	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Diabrotica speciosa</i> (CChr)	El Manantial, Tucumán, 11/03/04	150	897	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Kronides</i> sp. (HM)	San Vicente, 20/03/04	080	886	7468
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	San Vicente, 20/03/04	081	887	7469
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	San Vicente, 20/03/04	082	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Doru lineare</i> (DF)	El Manantial, Tucumán, 04/2004	151	898	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Euchistus</i> sp. (HP)	Ruta 36 y 511, 07/04/04	091	888	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 07/04/04	092	-	7471
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 13/04/04	098	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 20/04/04	099	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 20/04/04	110	889	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 20/04/04	111	-	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 28/04/04	112	-	-

<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 28/04/04	113	-	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 28/04/04	114	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	San Vicente, 09/05/04	115	890	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 12/05/04	116	-	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 12/05/04	117	-	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 12/05/04	118	-	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 36 y 511, 12/05/04	119	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Plagiodera erythroptera</i> (CChr)	San Vicente, 18/07/04	135	-	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	ECAS, Berazategui, 21/07/04	136	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 21/07/04	137	891	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Heilipodus erythropus</i> (CCur)	Ruta 11 Arroyo El Pescado, 18/08/04	138	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	Ruta 11, Estancia "La Soñada", 18/08/04	139	892	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	Ruta 11, Estancia "La Soñada", 18/08/04	140	893	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 11 Arroyo El Pescado, 18/08/04	141	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Pawiloma victima</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 25/08/04	142	894	-
<i>B. bassiana</i>	<i>P. victima</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 25/08/04	143	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>P. victima</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 25/08/04	144	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	ECAS, Berazategui, 25/08/04	145	895	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (C)	ECAS, Berazategui, 25/08/04	146	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>P. victima</i> (HCic)	San Vicente, 29/09/04	152	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	San Vicente, 29/09/04	153	899	-
<i>B. bassiana</i>	<i>B. melanocephala</i> (HCic)	San Vicente, 29/09/04	154	-	-
<i>B. bassiana</i>	Sp. no identificada (CCur)	Ruta 11, 06/10/04	156	-	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Cratomorphus diaphanus</i> (CL)	INTA Mercedes, Corrientes, 15/11/04	175	900	-
<i>B. bassiana</i>	<i>C. diaphanus</i> (CL)	INTA Mercedes, Corrientes, 15/11/04	176	901	-
<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Oncometopia tucumana</i> (HCic)	Horco Molle, Tucumán, 28/03/03	050	780	7200
<i>C. rosea</i>	<i>Sonesimia grossa</i> (HCic)	Colon, Entre Ríos, 27/09/03	066	785	7472
<i>Conidiobolus coronatus</i>	<i>Delphacodes haywardi</i> (HD)	Invernáculo, CEPAVE, La Plata, 19/08/03	062	-	-
<i>Conidiobolus coronatus</i>	<i>Delphacodes kuscheli</i> (HD)	Invernáculo CEPAVE, La Plata, 20/10/04	163	-	-
<i>Erynia dipterigena</i>	Sp. no identificada (DS)	Los Hornos, 01/12/04.	180	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Dichelops furcatus</i> (HP)	Los Pereyra, Santiago del Estero, 13/11/02	046	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	Suelo	San Vicente, 13/07/03	005	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	<i>D. kuscheli</i> (HD)	Invernáculo CEPAVE, La Plata, 06/06/05	202	-	-
<i>Lecanicillium muscarium</i>	<i>D. kuscheli</i> (HD)	Invernáculo, CEPAVE, La Plata 26/08/03	063	903	7781
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Suelo	San Vicente, 13/07/03	003	904	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Los Hornos, 24/02/04	076	905	7474

<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 9 Km. 75, 03/03/04	078	906	7475
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 9 Km. 75, 03/03/04	079	-	-
<i>M. anisopliae</i>	<i>Chauliognathus scriptus</i> (CCan)	Ruta 9, Arroyo Cañada Honda, 03/03/04	084	-	-
<i>M. anisopliae</i>	<i>Kanaima fluvialis</i> (HCer)	Los Hornos 30/03/04	085	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511 07/04/04	086	907	7476
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511 07/04/04	087	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511 07/04/04	088	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511 07/04/04	089	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no identificada (HP)	Ruta 36 y 511, 07/04/04	090	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511, 13/04/04	093	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511, 13/04/04	094	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511, 13/04/04	095	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511, 13/04/04	096	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511, 13/04/04	097	-	-
<i>M. anisopliae</i>	<i>K. fluvialis</i> (HCer)	Ruta 36 y 511, 12/05/04	120	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511, 18/05/04	121	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Ruta 36 y 511, 18/05/04	122	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Esteros del Iberá, Corrientes, 06/10/04	157	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Esteros del Iberá, Corrientes, 06/10/04	158	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Esteros del Iberá, Corrientes, 06/10/04	159	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Esteros del Iberá, Corrientes, 06/10/04	160	908	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Esteros del Iberá, Corrientes, 06/10/04	161	-	-
<i>M. anisopliae</i>	Sp. no ident. (HCer)	Esteros del Iberá, Corrientes, 06/10/04 (Ninfa)	162	-	-
<i>M. anisopliae</i>	<i>Kanaima fluvialis</i> (HCer)	INTA Bella Vista, Corrientes, 15/11/04	177	-	-
<i>M. anisopliae</i>	<i>K. fluvialis</i> (HCer)	INTA Bella Vista, Corrientes, 15/11/04	178	909	-
<i>M. anisopliae</i>	<i>K. fluvialis</i> (HCer)	INTA Bella Vista, Corrientes, 15/11/04	179	-	-
<i>Paecilomyces farinosus</i>	Suelo	Los Hornos, 03/07/03	004	910	7777
<i>P. fumosoroseus</i>	<i>Oliarus dimidiatus</i> (HCix)	Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, La Plata, 11/2001	031	769	7050

Tabla 1: Lista de aislamientos fúngicos depositados en las distintas colecciones micológicas. Referencias: DF: Dermaptera: Forficulidae, DS: Diptera: Sciaridae, HCer: Hemiptera: Cercopidae, HCic: Hemiptera: Cicadellidae, HCix: Hemiptera: Cixiidae, HD: Hemiptera: Delphacidae, HM: Hemiptera: Membracidae, HP: Hemiptera: Pentatomidae, C: Coleoptera, CCan: Coleoptera: Cantharidae, CChr: Coleoptera: Chrysomelidae, CCoc: Coleoptera: Coccinellidae, CCuc: Coleoptera: Curculionidae, CL: Coleoptera: Lampyridae. Nota: Las filas resaltadas en color gris corresponden a los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de Hemiptera Auchenorrhyncha.

Los aislamientos *Clonostachys rosea* CEP 050 y CEP 066 fueron también depositados en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holanda) bajo los números de acceso CBS 115882 y CBS 115883 respectivamente.

De los 92 aislamientos obtenidos se caracterizaron 65: 1 de *Beauveria* sp., 35 de *Beauveria bassiana*, 2 de *Clonostachys rosea*, 1 de *Lecanicillium muscarium*, 24 de *Metarhizium anisopliae*, 1 de *Paecilomyces farinosus* y 1 de *P. fumosoroseus*. Estos fueron caracterizados de acuerdo a las características morfométricas de las colonias y de los conidios.

A continuación se describen detalladamente las características de cada uno de los aislamientos caracterizados, mientras que un resumen de los datos merísticos y de los porcentajes de germinación de los conidios es expuesto en la Tabla 2.

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

***Beauveria* sp. (Aislamiento CEP 061)**

Las colonias alcanzaron un diámetro de $1,6 \pm 0,004 \times 1,6 \pm 0$ cm luego de 14 días de incubación a 23° C, en medio de cultivo AEM 2%, en oscuridad. Estas presentaron bordes regulares. Micelio algodonoso, tornándose con el paso del tiempo, de color amarillento en el centro de las colonias y creciendo elevado del medio de cultivo. Sin gotas de exudado. Reverso amarillento (Fig. 18 A). Conidios hialinos y globosos a elipsoidales, midiendo $2,5 \pm 0,06 \times 2,2 \pm 0,04$ μ m. Esta especie, no identificada aún, es cercana a *B. bassiana*, de la que se diferencia principalmente por el mayor tamaño de sus conidios (Humber, com. pers.).

Beauveria bassiana

Los diámetros alcanzados por las colonias de los distintos aislamientos de *B. bassiana*, luego de 14 días de incubación en medio de cultivo AEM 2% a 23° C en oscuridad oscilaron entre 1,3 x 1,4 y 3,5 x 3,6 cm (promedio: $2,2 \pm 0,09 \times 2,2 \pm 0,08$ cm). Los crecimientos radiales de las colonias de todos los aislamientos analizados fueron algo menores que los registrados por Fargues *et al.* (1997), quienes luego de analizar 65 aislamientos de *B. bassiana* provenientes de distintos hospedadores y substratos de varias regiones del mundo, obtuvieron rangos de crecimiento de $2,8 \pm 0,42$ mm a $6,2 \pm 0,06$ mm.

Las descripciones morfológicas de las colonias mostraron algunas diferencias en cuanto al tipo de crecimiento y coloración del micelio fúngico, así como también en la presencia o ausencia de gotas de exudado y la pigmentación del medio de cultivo. Atendiendo a estas diferencias se

pudieron detectar nueve morfotipos de colonias en los cuales quedaron agrupados todos los aislamientos caracterizados.

1. Colonias de bordes irregulares. Micelio blanco algodonoso creciendo muy elevado del medio de cultivo y dejando una depresión en el centro de la elevación. Ausencia de gotas de exudado. Reverso amarillo. Estas características morfológicas fueron presentadas por el aislamiento CEP (S) 001.
2. Colonias de bordes irregulares. Micelio blanco algodonoso creciendo de forma no compacta, al ras del medio de cultivo. Ausencia de gotas de exudado. Reverso no coloreado (aislamiento CEP 073).
3. Colonias de bordes irregulares. Micelio algodonoso y polvoriento, creciendo al ras del medio de cultivo. Sin gotas de exudado. Reverso no coloreado (aislamiento CEP 074).
4. Colonias de bordes irregulares. Micelio blanco algodonoso creciendo al ras del medio de cultivo. Esporulación abundante y pareja dando aspecto granulado a toda la superficie de la colonia. Con pequeñas gotas de exudado incoloro. Reverso amarillento (aislamiento CEP 150).
5. Colonias de bordes regulares. Micelio algodonoso y polvoriento, tornándose de color amarillento con el paso del tiempo, creciendo algo elevado del medio de cultivo. Sin gotas de exudado. Reverso no coloreado a levemente amarillento (aislamientos CEP 072, CEP 113 y CEP 141).
6. Colonias de bordes regulares. Micelio algodonoso y polvoriento, creciendo al ras del medio de cultivo y elevándose levemente en los bordes de la colonia. Sin gotas de exudado. Reverso incoloro a amarillo pálido, algo más oscuro en el centro de las colonias (aislamientos CEP 069, CEP 070, CEP 081, CEP 092, CEP 098, CEP 110, CEP 115, CEP 116, CEP 136, CEP 142, CEP 145, CEP 146 y CEP 176).
7. Colonias de bordes regulares. Micelio blanco algodonoso creciendo al ras del medio de cultivo. Presencia de sinemas en el centro de las colonias. Sin gotas de exudado. Reverso amarillento (aislamientos CEP 075 y CEP 091).
8. Colonias de bordes regulares. Micelio blanco creciendo bien al ras del medio de cultivo, con esporulación abundante y pareja en toda la superficie de la colonia. Aspecto granulado. Ausencia de gotas de exudado. Reverso incoloro (aislamientos CEP (S) 002, CEP 077, CEP 080, CEP 083, CEP 137, CEP 138, CEP 140, CEP 147, CEP 151, CEP 152, CEP 153 y CEP 154).
9. Colonias de bordes regulares. Micelio blanco algodonoso creciendo al ras del medio. Formación de sinemas en los bordes de las colonias y presencia de pequeñas gotas de exudado incoloras. Esporulación abundante de aspecto granulado. Reverso amarillento (aislamiento CEP 175).

Si bien se encontraron diferencias entre los aislamientos, en líneas generales las morfologías de las colonias fueron coincidentes con las descripciones realizadas por Brady

(1979a). Al igual que lo mencionado por dicho autor, raramente se observó la formación de sinemas por parte de los aislamientos estudiados. Algunos de los morfotipos más característicos de las colonias de *B. bassiana* se encuentran representados en la Figura 18.

En cuanto a la morfología de los conidios estos fueron hialinos y globosos a elipsoidales, midiendo $2,0 - 2,8 \times 1,9 - 2,4 \mu\text{m}$ (promedio: $2,4 \pm 0,04 \times 2,1 \pm 0,02 \mu\text{m}$). Tanto la morfología como las medidas de los conidios obtenidos en este estudio fueron coincidentes con los registrados por Brady (1979a). Los porcentajes de germinación de los conidios de todos los aislamientos fúngicos fueron en la mayoría de los casos superiores al 90%. Muchos de estos alcanzaron valores de 100%, no obstante, se registraron porcentajes de 61,86% (CEP 153), 68,93% (CEP 154), 72,04% (CEP 152), 80,5% (CEP 151), 82,42% (CEP 115) y 86% (CEP 153).

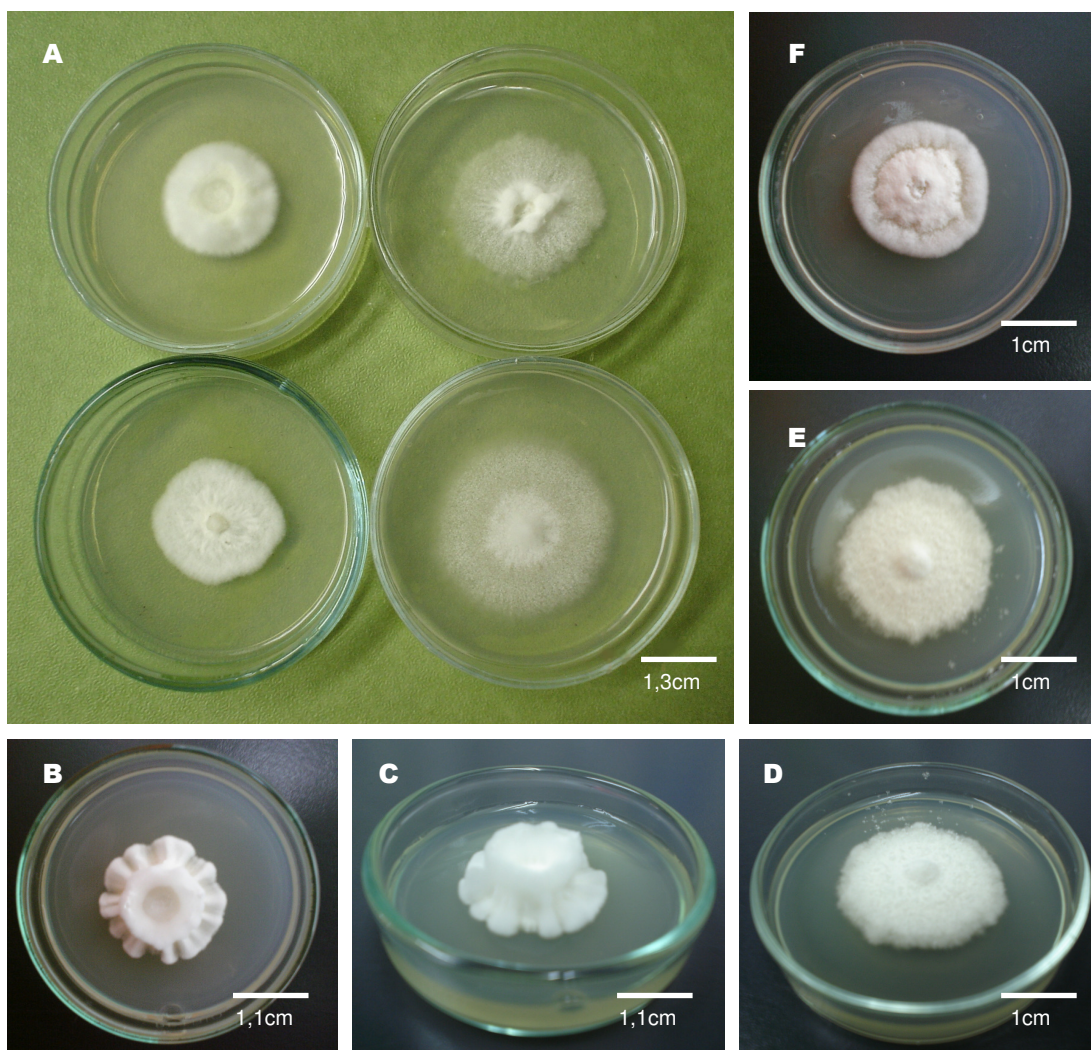


Fig. 18: Diferentes aspectos de colonias de distintos aislamientos de *Beauveria* sp. cultivados en AEM 2% bajo las mismas condiciones de incubación. **A:** Desde izquierda a derecha y desde arriba hacia abajo se observa el aspecto de las colonias de *Beauveria* sp CEP 061 y de *B. bassiana* CEP 075, CEP 081 y CEP 091, luego de 14 días de incubación a 23° C en oscuridad. **B-C:** Colonias del aislamiento CEP (S) 001. **D-E:** Colonias del aislamiento CEP 151. **F:** Colonia del aislamiento CEP (S) 002.

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Bionectriaceae

Clonostachys rosea (Link: Fries) Schroers, Samuels, Seifert & Gams. (Aislamiento CEP 050)

Las colonias alcanzaron un diámetro de $2,1 \pm 0,03 \times 2,2 \pm 0,03$ cm luego de 7 días de incubación a 25° C, en medio de cultivo APD. Las mismas presentaron bordes regulares, micelio blanco algodonoso formando hebras y con producción de pequeñas gotas incoloras de exudado. El reverso de las colonias fue primeramente incoloro, tornándose rosado a los 9 días de incubación. Los conidios hialinos de $6,5 \pm 0,31 \times 2,9 \pm 0,06$ μm fueron suavemente curvados y de extremos redondeados.

C. rosea (Aislamiento CEP 066)

Las colonias alcanzaron un diámetro de $2,5 \pm 0,03 \times 2,0 \pm 0,03$ cm luego de 7 días de incubación a 25° C, en medio de cultivo APD. La descripción de este aislamiento concuerda con la de CEP 050, excepto que el reverso de las colonias tomó un color amarillento pálido a los 7 días de incubación, el cual que se fue tornando más intenso luego de 14 días de observación. La descripción morfológica de los conidios de $7,5 \pm 0,35 \times 2,8 \pm 0,08$ μm también fue coincidente con el aislamiento anterior.

Las observaciones de las características morfológicas de ambos aislamientos de *C. rosea* concuerdan con aquellas reportadas previamente por Schroers *et al.* (1999) y Schroers (2001). El diámetro alcanzado por las colonias está estrechamente relacionado a aquellos descritos por dichos autores, al igual que la forma y medidas de los conidios.

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Lecanicillium muscarium (Petch) Zare & W. Gams. (Aislamiento CEP 063)

Colonias alcanzando un diámetro de $1,8 \pm 0,02 \times 1,8 \pm 0,02$ cm a los 10 días de incubación en medio de cultivo AEM 2% a 24° C en oscuridad. Bordes regulares, micelio blanco algodonoso, creciendo al ras del medio de cultivo. Sin gotas de exudado. Reverso amarillento. Conidios

formados en cabezuelas en el ápice de las fiálides, típicamente elipsoidales, de $4,1 \pm 0,22 \times 1,9 \pm 0,02 \mu\text{m}$.

Todas las características morfométricas obtenidas en este estudio fueron coincidentes con las registradas por Zare & Gams (2001).

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin **var. *anisopliae*** Tulloch.

Los diámetros alcanzados por las colonias de los distintos aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, luego de 14 días de incubación en medio de cultivo APD a 25° C en oscuridad oscilaron entre 2,2 x 2,2 y 4,2 x 4,1 cm (promedio: $3,2 \pm 0,12 \times 3,1 \pm 0,12$ cm). Las descripciones morfológicas de las mismas mostraron algunas diferencias en cuanto al tipo de crecimiento y coloración del micelio fúngico, así como también en la presencia o ausencia de gotas de exudado y la pigmentación del medio de cultivo. Atendiendo a estas diferencias se pudieron detectar nueve morfotipos de colonias en los cuales quedaron agrupados todos los aislamientos caracterizados.

1. Colonias de bordes regulares, con formación de paquetes de conidios en toda la superficie de las mismas (esporodoquios), que se fueron quebrando como costras de formas irregulares. En el centro de las colonias se observó el crecimiento de un micelio más fino que el resto creciendo elevado y cubriéndose de conidios. Las esporas presentaron un color verde oliváceo oscuro y en toda la superficie cubierta por las mismas se observaron pequeñas gotas de exudado. Reverso de color amarillo pálido en los márgenes de las colonias y amarillo más oscuro en el centro de las mismas. Estas características morfológicas fueron presentadas por los aislamientos CEP (S) 003, CEP 076 y CEP 079.
2. Colonias de bordes regulares, de aspecto casi perfectamente circular. Micelio creciendo al ras del medio de cultivo, bien adherido al mismo. La esporulación de color verde oliváceo oscuro fue uniformemente distribuida en toda la superficie de las colonias, sin mostrar costras quebradas. En toda la región esporulada se observaron pequeñas gotitas de exudado incoloras, en mayor cantidad en los márgenes. Reverso amarillo a castaño, más oscuro en el centro de las colonias (aislamientos CEP 078 y CEP 087).
3. Colonias de bordes regulares, de aspecto casi perfectamente circular. Micelio creciendo al ras del medio de cultivo, bien adherido al mismo. La esporulación de color verde oliváceo oscuro ocupó de manera uniforme toda la superficie de las colonias, sin

- mostrar costras quebradas ni gotas de exudado. Reverso amarillo pálido más oscuro en el centro de las colonias (aislamiento CEP 093).
4. Colonias de bordes regulares, casi circulares. Desarrollo de micelio fino muy abundante elevado del medio de cultivo formando agrupaciones casi esféricas sobre las cuales se observó la esporulación de color verde oliváceo oscuro. Presencia de gotas de exudado incoloras. Reverso amarillo anaranjado (aislamiento CEP 084).
 5. Colonias de bordes regulares, micelio blanco y fino creciendo casi al ras del medio de cultivo, algo elevado. Esporulación de color verde oliváceo oscuro, muy abundante y dispuesta en parches cubriendo casi la totalidad de las colonias. La esporulación del centro formó esporodoquios altos. Con gotas de exudado incoloras. Reverso incoloro, con algunas pequeñas zonas de color amarillo pálido (aislamientos CEP 085, CEP 086 y CEP 158).
 6. Colonias de bordes regulares, de aspecto casi perfectamente circular. Micelio creciendo al ras del medio de cultivo, bien adherido al mismo. La esporulación de color verde oliváceo oscuro ocupó de manera uniforme toda la superficie de las colonias, sin mostrar costras quebradas. En toda la región esporulada hubo producción de grandes gotas de exudado incoloras. Reverso amarillo pálido (CEP 088 y CEP 089).
 7. Colonias de bordes perfectamente regulares. Micelio blanco algodonoso, creciendo al ras del medio. Esporulación de color verde oliváceo claro ocupando parches disgregados en el centro de las colonias, pero no formando una capa continua. Ausencia de gotas de exudado. Reverso incoloro a amarillo pálido (aislamientos CEP 090, CEP 159, CEP 160, CEP 178 y CEP 179).
 8. Colonias de bordes irregulares, desarrollando en los márgenes un micelio fino y algodonoso que se expandió hacia la periferia y creció hacia arriba. La esporulación no fue pareja, sino que se observó en forma de rayos que se afinaron hacia la periferia. En los bordes de las colonias se observó un anillo de pequeñas áreas de esporulación discontinua de color verde oliváceo oscuro. Presencia de escasas gotas de exudado incoloro distribuidas uniformemente en toda la superficie de las colonias. Reverso amarillento (aislamientos CEP 094, CEP 096 y CEP 097).
 9. Colonias de bordes irregulares, desarrollando en los márgenes un micelio fino y algodonoso que se expandió hacia la periferia y creció hacia arriba. La esporulación no fue pareja, sino que se mostró en forma de rayos que se afinaron hacia la periferia. En los bordes de las colonias se observó un anillo de pequeñas áreas de esporulación discontinua de color verde oliváceo oscuro. Ausencia de gotas de exudado. Reverso amarillento (aislamientos CEP 095, CEP 120, CEP 121 y CEP 122).

En todos los casos la esporulación comenzó entre el sexto y noveno día de incubación. Algunos de los morfotipos de las colonias de *M. anisopliae* cultivadas en medio APD se encuentran representados en la Figura 19. En cuanto a la morfología de los conidios en todos los casos los mismos fueron cilíndricos, ahusados y con ambos extremos truncados, hialinos a

oliváceos o verdes y midiendo $6,5 - 9,2 \times 2,4 - 2,9 \mu\text{m}$ (promedio: $7,1 \pm 0,12 \times 2,8 \pm 0,03 \mu\text{m}$). Los porcentajes de germinación de los conidios de todos los aislamientos fúngicos fueron del 100%, a excepción de sólo dos de ellos, los cuales presentaron valores de 85,29% (CEP 078) y 90,79% (CEP 079).

En cuanto a las observaciones realizadas se puede mencionar que los conidios de algunos de los aislamientos mencionados resultaron ser algo más largos, con respecto a las longitudes que normalmente alcanza *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Brady, 1979b). Sin embargo, los conidios de estos aislamientos (CEP 178 y CEP 179) no fueron lo suficientemente largos como para ubicarlos dentro de otra variedad, como pudiera ser *M. anisopliae* var. *major* (Johnston) Tulloch.

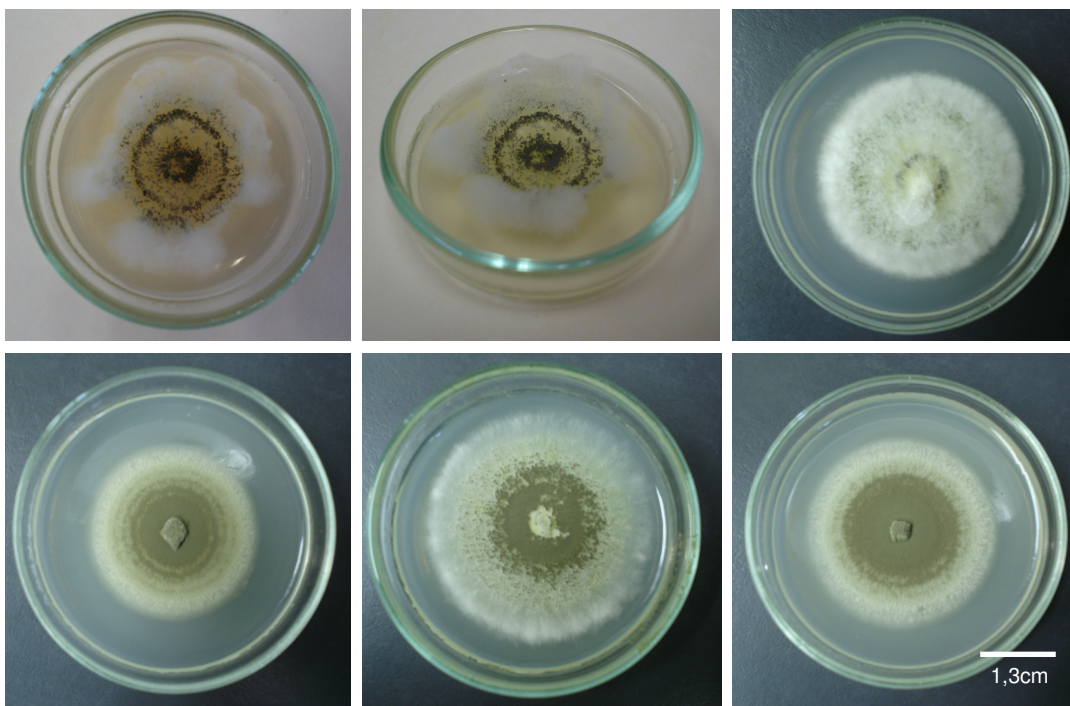


Fig. 19: Diferentes aspectos de colonias de distintos aislamientos de *Metarhizium anisopliae* cultivados en APD bajo las mismas condiciones de incubación. **A-B:** Colonias de *M. anisopliae* CEP-094, luego de 14 días de incubación a 25° C en oscuridad. **C:** Colonia de *M. anisopliae* CEP 178. **D:** Colonia de *M. anisopliae* CEP 093. **E:** Colonia de *M. anisopliae* CEP 090. **F:** Colonia de *M. anisopliae* CEP 088.

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Paecilomyces farinosus (Holm) Brown & Smith. (Aislamiento CEP (S) 004)

Colonias alcanzando un diámetro de $2,4 \pm 0,05 \times 2,1 \pm 0,03 \text{ cm}$ a los 14 días de incubación en AEM 2% a 25° C en oscuridad. Bordes regulares, micelio blanco, algodonoso y de aspecto

polvoriento, creciendo al ras del medio de cultivo. Luego de 14 días de incubación el micelio se tornó de color amarillento pálido en el centro de las colonias, dónde también se observó la presencia de pequeñas gotas incoloras de exudado. Reverso de color amarillo. Conidios con forma de limón, de $3,4 \pm 0,09 \times 2,0 \pm 0,05 \mu\text{m}$, fusiformes, hialinos y de paredes lisas, algunos de ellos agrupados en cadenas cortas.

Si bien el aspecto de las colonias y la forma de los conidios fueron coincidentes con los descriptos por Samson (1974), no ocurrió lo mismo en cuanto a los diámetros alcanzados por las primeras y los largos y anchos registrados para los segundos. En nuestro estudio las colonias alcanzaron diámetros menores a los registrados por este autor bajo las mismas condiciones de incubación (4 a 6 cm). De forma contraria los conidios de este aislamiento resultaron ser más largos y más anchos con respecto a los valores mencionados por el mismo autor ($2 - 3 \times 1 - 1,8 \mu\text{m}$).

***P. fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith. (Aislamiento CEP 031)**

Las colonias presentaron un desarrollo moderadamente rápido en medio de cultivo AEM 2%, alcanzando un diámetro de $3,2 \pm 0,02 \times 3,2 \pm 0,01 \text{ cm}$ a los 14 días de incubación en AEM 2% a 25°C en oscuridad. El micelio mostró un aspecto algodonoso y polvoriento, de color blanco al comienzo y tornándose con el correr de los días amarillento en el centro de las colonias. Se observó la formación de sinemas blanco amarillentos, y el reverso mostró una pigmentación amarilla. Conidios fusiformes con paredes lisas y hialinas, midiendo $3,6 \pm 0,08 \times 2,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$.

Al igual que para la especie anterior, este aislamiento presentó un crecimiento radial menor y conidios de mayores dimensiones en comparación con los valores de 4 cm y $3 - 4 \times 1 - 2 \mu\text{m}$, respectivamente, registrados por Samson (1974).

Número de colección	Diámetro de colonias (Media \pm ES) (cm)	Medidas de conidios (Media \pm ES) (μm)	Germinación de conidios (Media \pm ES) (%)
Bb CEP (S) 001	$2,2 \pm 0,01 \times 2,2 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,04 \times 2,0 \pm 0$	100
Bb CEP (S) 002	$2,5 \pm 0,04 \times 2,4 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,06 \times 2,1 \pm 0,04$	100
Bb CEP 061	$1,6 \pm 0,004 \times 1,6 \pm 0$	$2,5 \pm 0,06 \times 2,2 \pm 0,04$	$99,84 \pm 0,19$
Bb CEP 069	$1,6 \pm 0,02 \times 1,6 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,48 \times 2,0 \pm 0,15$	$90,01 \pm 5,1$
Bb CEP 070	$2,2 \pm 0 \times 2,1 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,06 \times 2,4 \pm 0,08$	$87,4 \pm 1,53$
Bb CEP 072	$1,5 \pm 0,02 \times 1,5 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,08 \times 1,9 \pm 0,04$	$94,78 \pm 2,6$
Bb CEP 073	$2,4 \pm 0,11 \times 2,4 \pm 0,12$	$2,7 \pm 0,07 \times 2,1 \pm 0,04$	$97,83 \pm 0,06$
Bb CEP 074	$1,5 \pm 0,01 \times 1,3 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,06 \times 2,3 \pm 0,06$	$98,02 \pm 0,69$
Bb CEP 075	$2,6 \pm 0,02 \times 2,2 \pm 0,04$	$2,0 \pm 0 \times 2,0 \pm 0$	$92,67 \pm 1,8$
Bb CEP 077	$2,8 \pm 0,04 \times 2,7 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,06 \times 2,1 \pm 0,06$	$91,34 \pm 4$
Bb CEP 080	$2,3 \pm 0,03 \times 2,2 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,08 \times 2,2 \pm 0,04$	100
Bb CEP 081	$1,9 \pm 0 \times 1,7 \pm 0,04$	$2,7 \pm 0,06 \times 2,3 \pm 0,06$	$95,36 \pm 2,31$
Bb CEP 083	$3,1 \pm 0,03 \times 2,9 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,06 \times 2,2 \pm 0,06$	$89,49 \pm 0,45$
Bb CEP 091	$2,8 \pm 0,02 \times 2,6 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,06 \times 2,1 \pm 0,06$	$97,87 \pm 0,8$
Bb CEP 092	$1,9 \pm 0,01 \times 1,9 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,06 \times 2,3 \pm 0,06$	$86,13 \pm 3,31$
Bb CEP 098	$1,9 \pm 0,01 \times 1,9 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,09 \times 2,0 \pm 0,03$	$94,27 \pm 1,99$
Bb CEP 110	$1,7 \pm 0 \times 1,6 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,06 \times 2,1 \pm 0,04$	100

Bb CEP 113	$1,9 \pm 0,02 \times 1,7 \pm 0,03$	$2,4 \pm 0,09 \times 2,2 \pm 0,05$	$96,77 \pm 1,27$
Bb CEP 115	$1,4 \pm 0,02 \times 1,4 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,08 \times 2,1 \pm 0,04$	$82,42 \pm 3,1$
Bb CEP 116	$1,8 \pm 0 \times 1,8 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,06 \times 2,0 \pm 0,02$	$96,29 \pm 1,09$
Bb CEP 136	$1,6 \pm 0,07 \times 1,8 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,04 \times 2,2 \pm 0,04$	100
Bb CEP 137	$3,6 \pm 0,06 \times 3,5 \pm 0,06$	$2,4 \pm 0,08 \times 2,1 \pm 0,04$	$99,18 \pm 0,79$
Bb CEP 138	$2,9 \pm 0,04 \times 2,8 \pm 0,03$	$2,5 \pm 0,08 \times 2,0 \pm 0,04$	$96,63 \pm 2,9$
Bb CEP 140	$2,7 \pm 0,04 \times 2,7 \pm 0,$	$2,2 \pm 0,06 \times 2,0 \pm 0$	$94,59 \pm 1,5$
Bb CEP 141	$1,8 \pm 0,02 \times 1,7 \pm 0$	$2,3 \pm 0,04 \times 2,0 \pm 0$	$89,39 \pm 1,6$
Bb CEP 142	$2,1 \pm 0,04 \times 2,2 \pm 0,06$	$2,1 \pm 0,04 \times 2,0 \pm 0$	$99,55 \pm 2,7$
Bb CEP 145	$2,1 \pm 0,02 \times 2,0 \pm 0,02$	$2,8 \pm 0,06 \times 2,3 \pm 0,06$	$88,73 \pm 3,4$
Bb CEP 146	$1,9 \pm 0,02 \times 1,8 \pm 0,02$	$2,6 \pm 0,08 \times 2,1 \pm 0,04$	$99,55 \pm 0,6$
Bb CEP 147	$2,3 \pm 0,04 \times 2,2 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,06 \times 2,1 \pm 0,04$	$96,5 \pm 1,6$
Bb CEP 150	$2,9 \pm 0,06 \times 2,8 \pm 0,02$	$2,1 \pm 0,05 \times 2,0 \pm 0$	$98,2 \pm 0,5$
Bb CEP 151	$2,6 \pm 0,04 \times 2,5 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,05 \times 2,0 \pm 0$	$80,5 \pm 5,5$
Bb CEP 152	$2,3 \pm 0,01 \times 2,1 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,06 \times 2,0 \pm 0,02$	$72,04 \pm 1,97$
Bb CEP 153	$2,3 \pm 0,02 \times 2,2 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,06 \times 2,0 \pm 0,02$	$61,86 \pm 7,47$
Bb CEP 154	$2,3 \pm 0,02 \times 2,1 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,08 \times 2,1 \pm 0,04$	$68,93 \pm 8,45$
Bb CEP 175	$2,7 \pm 0,03 \times 2,5 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,04 \times 2,0 \pm 0,02$	$99,87 \pm 0,16$
Bb CEP 176	$2,4 \pm 0,01 \times 2,3 \pm 0,02$	$2,0 \pm 0,02 \times 2,0 \pm 0$	100
Cr CEP 050	$2,1 \pm 0,03 \times 2,2 \pm 0,03$	$6,5 \pm 0,31 \times 2,9 \pm 0,06$	100
Cr CEP 066	$2,5 \pm 0,03 \times 2,0 \pm 0,03$	$7,5 \pm 0,35 \times 2,8 \pm 0,08$	100
Lm CEP 063	$1,8 \pm 0,02 \times 1,8 \pm 0,02$	$4,1 \pm 0,22 \times 1,9 \pm 0,02$	100
Ma CEP (S) 003	$2,7 \pm 0,02 \times 2,5 \pm 0,04$	$6,9 \pm 0,13 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 076	$2,7 \pm 0,01 \times 2,7 \pm 0,01$	$7,1 \pm 0,22 \times 2,6 \pm 0,07$	100
Ma CEP 078	$2,5 \pm 0,01 \times 2,5 \pm 0,01$	$7,3 \pm 0,1 \times 2,6 \pm 0,07$	$85,29 \pm 9,43$
Ma CEP 079	$2,4 \pm 0,02 \times 2,4 \pm 0,02$	$7,5 \pm 0,04 \times 2,8 \pm 0,01$	$90,79 \pm 8$
Ma CEP 084	$2,5 \pm 0,02 \times 2,5 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,06 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 085	$3,3 \pm 0,03 \times 3,3 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,12 \times 2,8 \pm 0,06$	100
Ma CEP 086	$3,7 \pm 0 \times 3,7 \pm 0,01$	$7,3 \pm 0,12 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 087	$2,2 \pm 0 \times 2,2 \pm 0$	$7,0 \pm 0,11 \times 2,8 \pm 0,11$	100
Ma CEP 088	$2,4 \pm 0,08 \times 2,4 \pm 0,08$	$7,0 \pm 0,17 \times 2,6 \pm 0,09$	100
Ma CEP 089	$2,8 \pm 0,07 \times 2,4 \pm 0,03$	$7,1 \pm 0,2 \times 2,7 \pm 0,08$	100
Ma CEP 090	$3,8 \pm 0,04 \times 3,7 \pm 0,05$	$6,8 \pm 0,09 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 093	$2,8 \pm 0 \times 2,8 \pm 0$	$7,3 \pm 0,1 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 094	$3,1 \pm 0,08 \times 3,1 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,07 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 095	$3,6 \pm 0,12 \times 3,5 \pm 0,12$	$7,1 \pm 0,11 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 096	$4,2 \pm 0,01 \times 4,0 \pm 0,03$	$6,6 \pm 0,12 \times 2,8 \pm 0,07$	100
Ma CEP 097	$3,4 \pm 0,05 \times 3,1 \pm 0,03$	$6,5 \pm 0,13 \times 2,6 \pm 0,09$	100
Ma CEP 120	$3,5 \pm 0,11 \times 3,4 \pm 0,12$	$6,6 \pm 0,15 \times 2,9 \pm 0,04$	100
Ma CEP 121	$4,1 \pm 0,05 \times 4,1 \pm 0,04$	$7,1 \pm 0,13 \times 2,8 \pm 0,06$	100
Ma CEP 122	$3,9 \pm 0,11 \times 3,9 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,09 \times 2,9 \pm 0$	100
Ma CEP 158	$3,5 \pm 0,02 \times 3,3 \pm 0,04$	$6,9 \pm 0,12 \times 2,4 \pm 0,08$	100
Ma CEP 159	$3,2 \pm 0,06 \times 3,0 \pm 0,06$	$7,4 \pm 0,16 \times 2,9 \pm 0,04$	100
Ma CEP 160	$3,2 \pm 0,02 \times 3,0 \pm 0,04$	$7,2 \pm 0,12 \times 2,8 \pm 0,04$	100
Ma CEP 178	$3,0 \pm 0,04 \times 2,9 \pm 0,02$	$8,1 \pm 0,16 \times 2,9 \pm 0,06$	100
Ma CEP 179	$3,4 \pm 0,02 \times 3,3 \pm 0,04$	$9,2 \pm 0,22 \times 2,9 \pm 0,06$	100
P fa CEP (S) 004	$2,4 \pm 0,05 \times 2,1 \pm 0,03$	$3,4 \pm 0,09 \times 2,0 \pm 0,05$	$99 \pm 0,6$
P fu CEP 031	$3,2 \pm 0,02 \times 3,2 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,08 \times 2,4 \pm 0,1$	100

Tabla 2: Medidas de diámetro de las colonias, largo y ancho de los conidios y porcentajes de germinación de los mismos calculadas para cada uno de los 65 aislamientos fúngicos caracterizados y depositados en las distintas colecciones micológicas. Referencias: Bb = *Beauveria bassiana*, Cr = *Clonostachys rosea*, Lm

= *Lecanicillium muscarium*, Ma = *Metarhizium anisopliae*, P fa = *Paecilomyces farinosus*, P fu = *P. fumosoroseus*, (S) = suelo.

Debido a que se obtuvieron varios aislamientos de *B. bassiana* a partir de Hemípteros y de Coleópteros, se realizaron con ellos análisis de correlación y de la varianza (ANOVA). El resultado fue la inexistencia de correlación entre los tres parámetros emparejados (diámetro de colonias, tamaño de conidios y porcentajes de germinación de los mismos). Los valores del coeficiente de correlación y de probabilidad para cada uno de los pares fueron: diámetro de colonias / tamaño de conidios ($r = -0,17$; $P = 0,34$), diámetro de colonias / porcentajes de germinación de conidios ($r = -0,007$; $P = 0,97$) y tamaño de conidios / porcentajes de germinación de conidios ($r = -0,09$; $P = 0,59$).

Mediante el ANOVA no se detectaron diferencias significativas en cuanto a los diámetros de las colonias alcanzados por los 18 aislamientos de *B. bassiana* provenientes de Hemípteros con respecto a los registrados para los 14 aislamientos de la misma especie fúngica provenientes de Coleópteros ($F = 0,004$; gl = 30; $P = 0,98$). Lo mismo se obtuvo en cuanto al tamaño de los conidios ($F = 2,06$; gl = 30; $P = 0,16$) y los porcentajes de germinación de los mismos ($F = 2,75$; gl = 30; $P = 0,11$). Estos resultados no son coincidentes con los obtenidos por Fargues *et al.* (1997), quienes registraron diferencias significativas en el crecimiento radial de distintos aislamientos de esta especie fúngica procedentes de distintos hospedadores.

Un análisis similar fue efectuado para los 22 aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos a partir de Hemípteros Cercopidae provenientes de 5 localidades diferentes: La Plata, Los Hornos, San Antonio de Areco (Buenos Aires), Esteros del Iberá y Bella Vista (Corrientes).

Los resultados del análisis de correlación no mostraron ninguna relación entre el diámetro de las colonias y el tamaño de los conidios ($r = 0,09$; $P = 0,66$), entre el diámetro de las colonias y los porcentajes de germinación de los conidios ($r = 0,22$; $P = 0,32$), ni entre el tamaño de los conidios y los porcentajes de germinación de los mismos ($r = -0,27$; $P = 0,22$).

Mediante el ANOVA no se detectaron diferencias significativas en cuanto al diámetro de colonias de los 22 aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos a partir de Hemípteros Cercopidae provenientes de diferentes localidades ($F = 1,08$; gl = 4; $P = 0,39$), aunque si las hubo en cuanto a la medida de los conidios ($F = 5,89$; gl = 4; $P = 0,0037$) y los porcentajes de germinación de los mismos ($F = 73,08$; gl = 4; $P = 0,0000$). Tanto los aislamientos provenientes de San Antonio de Areco (Buenos Aires) como los de Bella Vista (Corrientes) presentaron los conidios de mayor tamaño; aunque aquellos provenientes de la primera localidad citada resultaron ser los menos viables. Mediante el test LSD se detectó la presencia de 3 grupos homogéneos para el tamaño de los conidios y de 2 para los porcentajes de germinación de los mismos. Los resultados del análisis para los parámetros que presentaron diferencias significativas se muestran en la Tabla 3.

Localidad de procedencia	Tamaño de conidios (cm)	Germinación de conidios (%)
La Plata, Buenos Aires.	2,45 ± 0,04 a	100 ± 0,0 b
Los Hornos, Buenos Aires.	2,56 ± 0,24 ab	100 ± 0,0 b
Esteros del Iberá, Corrientes.	2,67 ± 0,13 ab	100 ± 0,0 b
San Antonio de Areco, Buenos Aires.	2,76 ± 0,09 bc	88,04 ± 2,75 a
Bella Vista, Corrientes.	2,98 ± 0,27 c	100 ± 0,0 b

Tabla 3: Resultados del ANOVA para el tamaño de los conidios y los porcentajes de germinación de los mismos (media ± ES), de aislamientos de *M. anisopliae* provenientes de Hemípteros Cercopidae recolectados en 5 localidades diferentes. Los valores seguidos por la misma combinación de letras no presentan diferencias significativas para el test a posteriori LSD ($\alpha = 0,05$).

II.4. CONCLUSIONES

De un total de 1.100 hemípteros Auchenorrhyncha recolectados durante el período de muestreo, 98 estuvieron infectados con hongos patógenos, generalmente cubiertos de micelio fúngico. Casi en su totalidad los Auchenorrhyncha muertos por acción fúngica fueron recolectados desde plantas de *Eryngium* sp., aunque se registraron 2 spp. de Delphacidae y 1 de Cicadellidae infectadas sobre cebada forrajera y lechuga respectivamente. Por otro lado, en cultivos de maíz se encontraron afectados representantes de los órdenes Coleoptera y Dermaptera.

A partir de los insectos infectados se identificaron 11 géneros y 13 especies de hongos entomopatógenos correspondientes a *Aphanocladium* sp., *Beauveria* sp., *Beauveria bassiana*, *Fusarium* sp., *Hirsutella* sp., *Lecanicillium muscarium*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus*, *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales); *Conidiobolus coronatus*, *Erynia dipterigena* y *Zoophthora radicans* (Zygomycota: Entomophthorales). A partir de muestras de suelo tomadas en cultivos de maíz y sorgo se aislaron *B. bassiana*, *Fusarium* sp., *M. anisopliae* y *P. farinosus*.

Las dos especies fúngicas más frecuentemente encontradas infectando a los insectos en el campo fueron *B. bassiana* y *M. anisopliae*, representando entre ambos 8,3% del 8,9% de infecciones fúngicas totales registradas en hemípteros Auchenorrhyncha.

Sobre la base de los insectos recolectados se observó, que los individuos en estado adulto fueron los más frecuentemente afectados. *Beauveria bassiana* mostró una mayor incidencia de infección en las hembras (N = 22), que en los machos (N = 13), mientras que *M. anisopliae* fue más frecuentemente encontrado infectando a machos (N = 33) que a hembras (N = 18). Excepcionalmente *B. bassiana* se registró infectando ninfas de *B. melanocephala* (Cicadellidae) y *Kronides* sp. (Membracidae) y *M. anisopliae* ninfas de Cercopidae y Pentatomidae.

Se lograron obtener 92 aislamientos puros, los cuales fueron depositados en colecciones micológicas.

Se caracterizaron 65 aislamientos y se obtuvieron 9 morfotipos de colonias para *B. bassiana* y 9 para *M. anisopliae*.

No se detectó correlación entre el diámetro de colonias, el tamaño y porcentajes de germinación de los conidios en los 32 aislamientos de *B. bassiana* y los 22 de *M. anisopliae* estudiados.

En cuanto al diámetro de las colonias, tamaño y porcentajes de germinación de los conidios de los diferentes aislamientos de *B. bassiana* provenientes de diferente orden de insecto hospedador (Hemiptera vs. Coleoptera), no se registraron diferencias significativas. En cambio si expresaron diferencias significativas las medidas de los conidios y los porcentajes de germinación de los mismos de los aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos a partir de Hemípteros Cercopidae recolectados en diferentes localidades.

Se incorporaron 22 nuevos hospedadores pertenecientes a los órdenes Hemiptera (11 Auchenorrhyncha y 3 Heteroptera), Coleoptera y Diptera contribuyendo a ampliar el espectro de hospedadores natural de los hongos entomopatógenos presentes en la Argentina.

CAPITULO III. Evaluación de la patogenicidad de hongos Hypocreales contra Delphacidae y Cicadellidae vectores de patógenos al maíz.

III.1. INTRODUCCION

Los Delphacidae “planthoppers” y Cicadellidae “leafhoppers” son considerados una de las plagas más importantes que atacan al maíz debido a la capacidad de los mismos de actuar como vectores de fitopatógenos. En áreas tropicales y subtropicales, el maíz puede ser infectado con virus y espiroplasmas destructivos vehiculizados por *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae) y *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) que representan los vectores de mayor importancia en el neotrópico (Remes Lenicov & Virla, 1999a).

Varias especies de hongos entomopatógenos han sido aisladas a partir de delfácidos y cicadélidos plaga de cultivos de arroz en el continente asiático. En esas latitudes el incremento de la resistencia a los insecticidas por parte de las plagas y los altos costos de los químicos sintéticos, han promovido la búsqueda e investigación de métodos de control alternativos, entre los que se incluye el uso de hongos entomopatógenos (Inch *et al.*, 1986).

Estudios previos indican que *Paecilomyces fumosoroseus* y *P. farinosus* resultaron ser patogénicos contra adultos de *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae) bajo condiciones de laboratorio. Los valores de mortalidad ocasionados por estas especies fúngicas fueron de 85% - 95% luego de siete días de incubación a 25° C (Gillespie, 1984). Posteriormente, Rombach *et al.* (1986b) evaluaron la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, *Beauveria bassiana* e *Hirsutella citriformis* en estudios a campo contra la misma especie de insecto, obteniendo valores de mortalidad que oscilaron entre 47% y 100%.

En América latina, recientes estudios demostraron la patogenicidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra *Dalbulus maidis*. En este caso, los valores de mortalidad registrados fueron de 30% – 40% transcurridos 25 días desde la aplicación del inóculo (Ibarra-Aparicio *et al.*, 2005).

Entre los hongos Hypocreales utilizados como agentes potenciales de control biológico de delfácidos y cicadélidos, *B. bassiana* es uno de los más utilizados debido a su alta virulencia y a la facilidad con la que puede ser producido masivamente, almacenado y aplicado (Rice & Choo, 2000). Varios estudios han demostrado que esta especie fúngica, más allá de encontrarse comúnmente en suelos y de ser patogénica para un gran número de especies de insectos, presenta una simbiosis endofítica con el maíz (Lewis & Cossentine, 1986; Lewis & Bing, 1991; Wagner & Lewis, 2000). Wagner & Lewis (2000) sugieren que dada la conocida producción extracelular de metabolitos antimicrobianos, esta asociación simbiótica conferiría a la planta protección contra eventuales fitopatógenos.

El objetivo de este capítulo fue evaluar, bajo condiciones de laboratorio, la patogenicidad de una selección de aislamientos fúngicos nativos, principalmente de *B. bassiana*, contra adultos de *P. maidis*, *D. kuscheli* y *D. maidis*.

III.2. MATERIALES Y METODOS

III.2.1. Cría de insectos para pruebas de patogenicidad

Los insectos fueron obtenidos de las colonias que se mantienen desde el año 2002, en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). Tanto delphacidos como cicadélidos fueron mantenidos de forma continua a una temperatura media anual de 20,7° C (min.: 10° C – máx.: 34° C) y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad en un invernáculo de 3 x 2 x 2 m, constituido por paneles de vidrio. El invernáculo fue calefaccionado con un radiador de aceite durante los meses de invierno y refrigerado mediante la cobertura del techo con una tela de media sombra oscura durante los meses de verano.

Delphacodes kuscheli (Hemiptera: Delphacidae) fue criado sobre *Hordeum vulgare* L., “cebada forrajera”, mientras que *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae) y *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) fueron mantenidos sobre *Zea mays* L., “maíz”. Ambos cereales fueron sembrados en macetas plásticas de 1.000 cc de capacidad y aislados con jaulas de PET (tereftalato de polietileno) de 24 cm de alto x 8,7 cm de diámetro provistas de tres aberturas, una superior cubierta con tela de voile y dos laterales obturadas con algodón (Fig. 1).

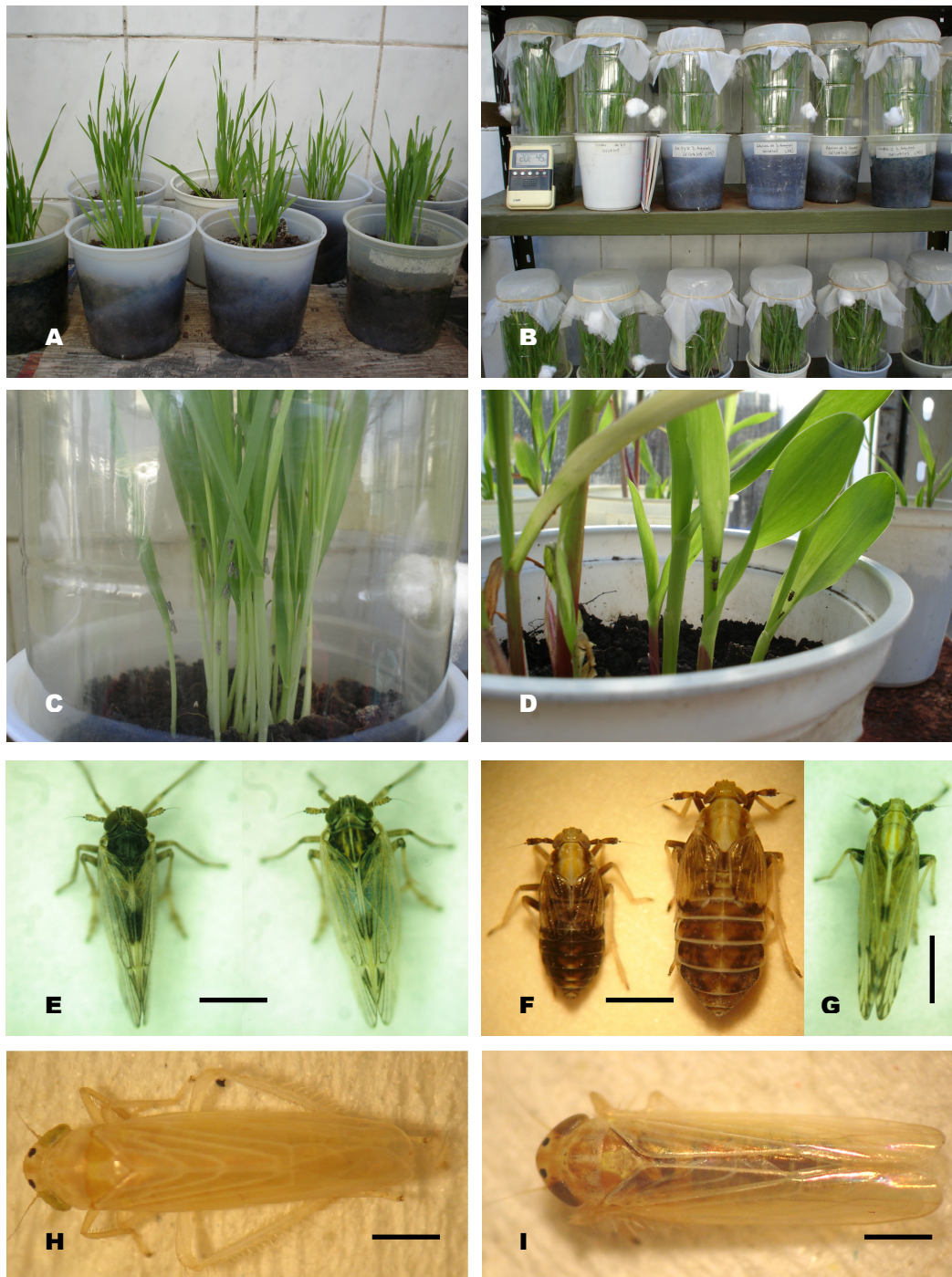


Fig. 1: Cría de insectos y plantas hospedantes en el invernáculo del CEPAVE. **A:** Plantas de cebada forrajera en macetas plásticas de 1.000 cc de capacidad. **B:** Diseño de las jaulas de cría de delfácidos y cicadélidos. **C:** Detalle de una jaula donde pueden verse los adultos alimentándose sobre los tallos y las hojas de la base de las plantas. **D:** Plantas de maíz con adultos de *Peregrinus maidis*. **E:** Adultos de *Delphacodes kuscheli*, macho (izquierda) y hembra (derecha). Escala: 0,7 mm. **F:** Adultos braquípteros de *P. maidis*, macho (izquierda) y hembra (derecha). Escala: 0,8 mm. **G:** Macho macróptero de *P. maidis*. Escala: 1 mm. **H:** Hembra de *Dalbulus maidis*. Escala: 0,7 mm. **I:** Macho de *D. maidis*. Escala: 0,6 mm.

III.2.2. Cultivo de maíz como hospedante para pruebas de patogenicidad

Los cultivos se realizaron en medios hidropónicos colocando una semilla de maíz sobre un sustrato inerte (Perlita Agrícola, Perlome, Bertinat®) contenido en frascos de vidrio de 200 cc e inundado con una solución de fertilizante Nitrofoska® líquido, activador completo (Nitrógeno (N): 7%, Fósforo (P): 1,30%, Potasio (K): 4%. Oligoelementos: hierro, zinc, boro y otros). La solución contenida en los recipientes (5 ml de fertilizante en 1.000 ml de agua), fue drenada y reemplazada cada semana hasta alcanzar las plántulas de maíz un estado de tres hojas (diez días), momento en el cual fueron utilizadas como sustrato para la alimentación de los insectos destinados a los ensayos de patogenicidad. Los cultivos fueron mantenidos en el invernáculo del CEPAVE (Fig. 2).



Fig. 2: Mantención de cultivos hidropónicos en el invernáculo del CEPAVE. En todas las figuras se observan los recipientes de vidrio conteniendo el sustrato inerte fertilizado y las plántulas de maíz en desarrollo.

III.2.3. Pruebas de patogenicidad

Selección de aislamientos fúngicos: Diez aislamientos de *Beauveria bassiana*, 1 de *Lecanicillium muscarium*, 4 de *Metarhizium anisopliae*, 1 de *Paecilomyces farinosus* y 1 de *P. fumosoroseus*, seleccionados en base a la afinidad de los insectos hospedadores, a las distintas plantas hospedantes en donde fueron recolectados los insectos infectados, a la localidad de origen de los mismos y a los mayores porcentajes de germinación de conidios, fueron evaluados mediante ensayos preliminares de patogenicidad contra individuos adultos de *P. maidis*.

Los hongos entomopatógenos fueron obtenidos a partir de insectos Hemípteros de las familias Cercopidae, Cicadellidae, Cixiidae, Delphacidae y Membracidae, de Coleópteros Coccinellidae y Chrysomelidae, de Dermápteros Forficulidae y de muestras de suelo de cultivos de maíz y sorgo, provenientes de distintas localidades de las provincias de Buenos Aires, Corrientes y Tucumán. Los aislamientos fueron mantenidos hasta su utilización en la colección Micológica del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE).

Cada una de las especies fúngicas, fue cultivada durante 10 días a 25° C en oscuridad en medio de cultivo agar extracto de malta 2%. Por cada aislamiento se utilizaron dos cápsulas de Petri de 6 cm de diámetro.

Para preparar el inóculo los conidios fueron extraídos desde el medio de cultivo sólido mediante el uso de dispositivos de plástico previamente esterilizados ("Disposable cell scraper" Fisherbrand®). Los conidios, fueron colocadas en tubos de ensayo conteniendo 5ml de Tween® 80 (Merck) (Polisorbato 80) 0,01% v/v. y agitados en un vórtex durante 1 minuto para lograr una suspensión homogénea. A partir de esta suspensión, se realizaron dos diluciones seriadas 1/10 con el fin de cuantificar la concentración del inóculo en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) (Fig. 3).

El porcentaje de germinación de los conidios de cada aislamiento fue estimado de acuerdo a la metodología detallada en el capítulo II.

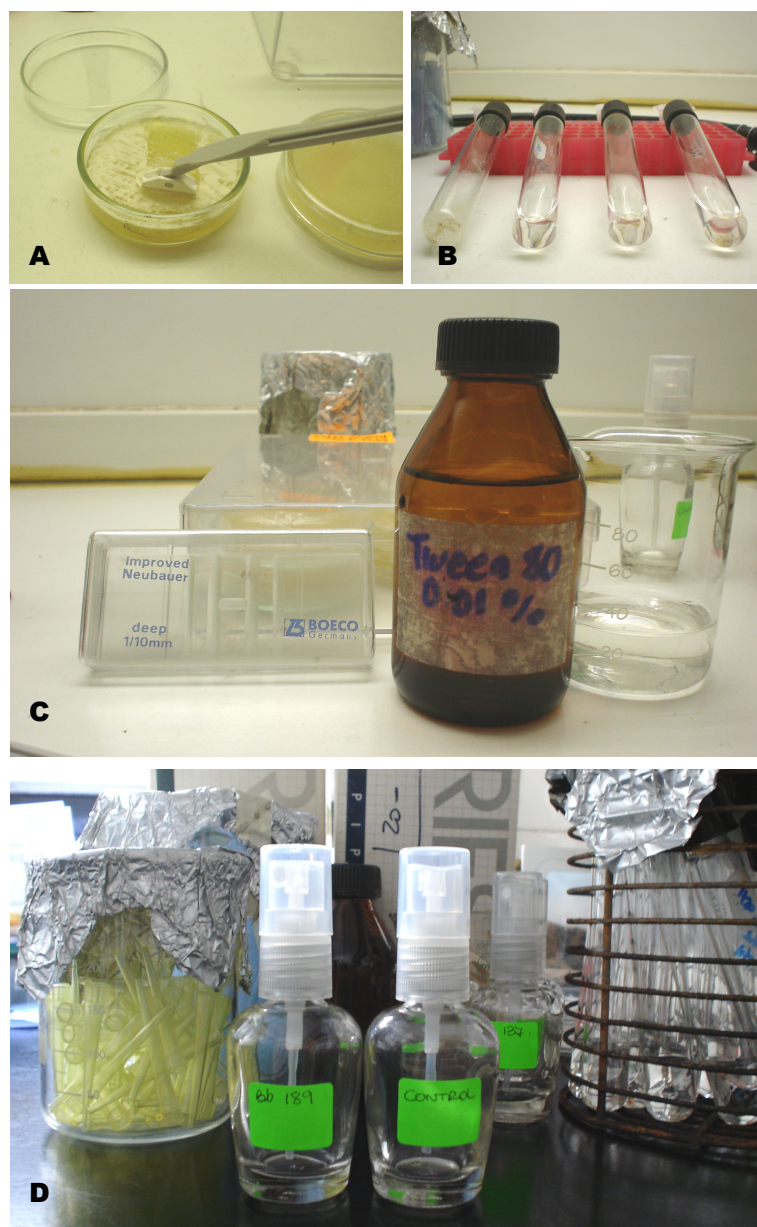


Fig. 3: Preparación de una suspensión de conidios a partir de aislamientos fúngicos mantenidos en medio de cultivo sólido. **A:** Cosecha de conidios a partir de cultivos sólidos. **B:** Tubos de vidrio con tapa a rosca conteniendo cada uno 5 ml de Tween 80. **C:** Cámara de Neubauer para el recuento de propágulos de la suspensión a inocular. **D:** Aspersores de vidrio para realizar las aplicaciones.

Para cada aislamiento fúngico se utilizaron 60 individuos adultos, de aproximadamente 10 días de emergidos, dispuestos en grupos de 20 por réplica. Un total de 80 insectos distribuidos de la misma manera fue utilizado como control. Por cada réplica se utilizaron 10 machos y 10 hembras, con motivo de detectar la existencia de susceptibilidad diferencial asociada al sexo del insecto hospedador.

Los ejemplares fueron inoculados dentro de botellas de PET (ptereftalato de polietileno) de 500 cc selladas en su extremo superior con film adherente perforado para la aireación. Se aplicó una suspensión de 1×10^7 conidios/ml. mediante el uso de aspersores de vidrio de 26 cc de capacidad, previamente esterilizados. El volumen suministrado a cada réplica fue de 350 μ l.

Los controles fueron rociados con 350 μ l de Tween 80. Las aspersiones sobre los insectos se realizaron antes de ponerlos en contacto con las plántulas de maíz.

Los insectos tratados y los controles fueron colocados inmediatamente sobre las plántulas de maíz dentro de los mismos recipientes utilizados para la inoculación y mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ$ C), humedad relativa (media: 69,8 % - min.: 53% - máx.: 83%) y fotoperíodo (14:10 h luz: oscuridad) (Fig. 4).



Fig. 4: Diseño experimental de los ensayos de patogenicidad mostrando: insectos tratados y controles en grupos de 20 por réplica colocados en botellas de PET sostenidas en posición invertida por frascos de vidrio conteniendo cultivos hidropónicos de maíz.

Los registros de mortalidad se realizaron cada 24 horas desde el inicio y hasta los 7 días posteriores a la inoculación. Los cadáveres fueron retirados diariamente con la utilización de pinzas entomológicas y esterilizados superficialmente de acuerdo a Lacey & Brooks (1997). Los especímenes tratados fueron sumergidos en baños sucesivos de alcohol 70% (30 segundos), agua destilada, hipoclorito de sodio al 0,5% (1 minuto), agua destilada y por último secados en papel de filtro estéril (Fig. 5). Luego de la esterilización, los ejemplares fueron colocados en cámaras húmedas e incubados a 25° C. Para verificar la emergencia del micelio fúngico de la especie inoculada se realizaron preparaciones y se examinaron bajo microscopio óptico equipado con contraste de fases.

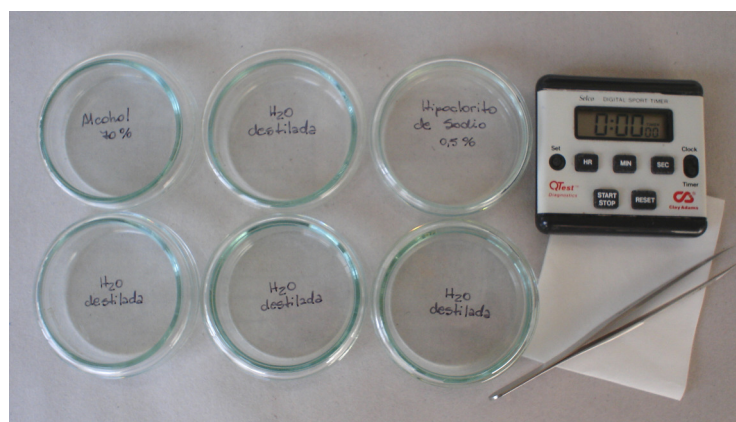


Fig. 5: Materiales utilizados para la esterilización de la superficie corporal de los insectos infectados, muertos durante los ensayos de patogenicidad. Se pueden ver las cápsulas de Petri de 6cm de diámetro conteniendo alcohol 70%, agua destilada e hipoclorito de sodio 0,5%, además de un cronómetro, una pinza entomológica y un fragmento de papel absorbente previamente esterilizado.

A fin de obtener parámetros que permitan seleccionar el aislamiento fúngico más agresivo contra *P. maidis* se calculó la mortalidad porcentual acumulada a los 7 días posteriores a la inoculación. Para tal fin se consideraron muertos por infección fúngica sólo aquellos insectos que presentaron desarrollo externo de micelio dentro de los 3 días posteriores a su muerte. Las diferencias en los niveles de mortalidad entre los tratamientos, incluyendo los controles, fueron analizadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Fisher de diferencias mínimas significativas (LSD) ($\alpha = 0.05$) (STSC, Statgraphics, 1987). Los datos fueron presentados en tablas.

Evaluación de la patogenicidad del aislamiento fúngico seleccionado: Una vez evaluada la actividad biológica de los distintos aislamientos fúngicos contra *P. maidis*, se seleccionó el aislamiento más virulento para realizar pruebas de patogenicidad contra *P. maidis*, *Delphacodes kuscheli* y *Dalbulus maidis*. El ensayo se realizó bajo las mismas condiciones experimentales descriptas anteriormente y fue repetido una vez en el tiempo. En este caso los datos de mortalidad fueron registrados por un total de 14 días a fin de obtener el tiempo medio de mortalidad ($TM = \sum [Días_n \times insecto\ infectado_n] / \text{total de insectos infectados}$), utilizando la fórmula citada en Lecuona & Díaz (2001). Los datos fueron analizados mediante el ANOVA o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de aislamientos fúngicos

En la Tabla 1 se presentan los datos de los aislamientos fúngicos evaluados contra *P. maidis*.

Aislamiento fúngico	Hospedador / substrato	Localidad, provincia y fecha de muestreo
B.b 001	Suelo de cultivos de maíz	Magdalena, Buenos Aires, 30/05/03
B.b 002	Suelo de cultivos de maíz	Los Hornos, Buenos Aires, 03/07/03
B.b 074	<i>B. melanocephala</i> HC2/ <i>Eryngium</i> sp.	Berazategui, Buenos Aires, 30/12/03
B.b 080	<i>Kronides</i> sp. HM / <i>Eryngium</i> sp.	San Vicente, Buenos Aires, 20/03/04
B.b 137	<i>B. melanocephala</i> / <i>Eryngium</i> sp.	Berazategui, Buenos Aires, 21/07/04
B.b 142	<i>Pawiloma victima</i> HC2/ <i>Eryngium</i> sp.	Berazategui, Buenos Aires, 25/08/04
B.b 147	<i>Cycloneda sanguinea</i> CC1/ maíz	El Manantial, Tucumán, 11/03/04
B.b 150	<i>Diabrotica speciosa</i> CC2/ maíz	El Manantial, Tucumán, 11/03/04
B.b 151	<i>Doru lineare</i> DF/ maíz	El Manantial, Tucumán, 04/2004
B.b 189	<i>O. dimidiatus</i> / arroz	Los Hornos, Buenos Aires, 09/03/05
L.m 063	<i>Delphacodes kuscheli</i> HD/ cebada	La Plata, Buenos Aires, 26/08/03
M.a 003	Suelo de cultivos de sorgo	San Vicente, Buenos Aires, 13/07/03
M.a 086	Cercopidae HC3/ <i>Eryngium</i> sp.	La Plata, Buenos Aires, 07/04/04
M.a 160	Cercopidae/ <i>Eryngium</i> sp.	Esteros del Iberá, Corrientes, 06/10/04
M.a 178	<i>Kanaima fluvialis</i> / <i>Eryngium</i> sp.	Bella Vista, Corrientes (INTA), 15/11/04
P.fa 004	Suelo de cultivos de maíz	Los Hornos, Buenos Aires, 03/07/03
P.fu 031	<i>Oliarus dimidiatus</i> HC1/ gramíneas	La Plata, Buenos Aires, 11/2001

Tabla 1: Detalle de los datos de especie fúngica con su número de acceso a la colección del CEPAVE, hospedador/ substrato y procedencia de los aislamientos evaluados contra *P. maidis*. Referencias: B.b: *Beauveria bassiana*, L.m: *Lecanicillium muscarium*, M.a: *Metarhizium anisopliae*, P.fa: *Paecilomyces*

farinosus, P.fu: *P. fumosoroseus*. CC1: Coleoptera: Coccinellidae, CC2: Coleoptera: Chrysomelidae, DF: Dermaptera: Forficulidae, HC1: Hemiptera: Cixiidae, HC2: Hemiptera: Cicadellidae, HC3: Hemiptera: Cercopidae, HD: Hemiptera: Delphacidae, HM: Hemiptera: Membracidae.

Luego de 7 días posteriores a la inoculación se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 2,38$; $gl = 17$; 37 ; $P = 0,014$). Los aislamientos fúngicos inoculados presentaron porcentajes de germinación de los conidios entre 80,5% - 100% y ocasionaron una mortalidad acumulada que osciló entre 18,51% y 69,77%, siendo la mortalidad promedio de 35,5% (Tabla 2).

Tratamiento	Germinación de conidios	Mortalidad acumulada
Control		6,25 ± 3,15 a
B.b. 001	100	20,18 ± 8,34 ab
B.b. 002	100	32,57 ± 15,38 abcd
B.b. 074	98,02 ± 0,69	20,0 ± 11,55 ab
B.b. 080	100	45,52 ± 2,34 bcde
B.b. 137	99,18 ± 0,79	24,38 ± 4,95 abc
B.b. 142	99,55 ± 2,7	23,33 ± 13,33 abc
B.b. 147	96,5 ± 1,6	69,77 ± 6,44 e
B.b. 150	98,2 ± 0,5	59,86 ± 11,54 de
B.b. 151	80,5 ± 5,5	42,17 ± 10,20 bcde
B.b. 189	99,5 ± 0,3	52,87 ± 5,31 cde
L.m. 063	100	36,29 ± 12,61 bcd
M.a. 003	100	18,51 ± 8,25 ab
M.a. 086	100	35,16 ± 18,64 abcd
M.a. 160	100	26,97 ± 7,99 abc
M.a. 178	100	31,78 ± 12,58 abcd
P. fa. 004	99 ± 0,6	19,44 ± 10,01 ab
P. fu. 031	100	44,09 ± 17,15 bcde

Tabla 2: Valores de porcentaje de germinación de los conidios de los diferentes aislamientos fúngicos utilizados y de mortalidad porcentual acumulada provocada por los distintos tratamientos en *P. maidis*. Los datos están expresados en media ± error estándar. Los valores seguidos por las mismas combinaciones de letras no presentan diferencias significativas para el test LSD ($\alpha = 0,05$).

Proporcionalmente fueron infectados más hembras que machos, aunque mediante el ANOVA no se detectaron diferencias significativas ($F = 0,73$; $gl = 1$; 108 ; $P = 0,39$). Los porcentajes de mortalidad fueron similares en machos ($31,04 \pm 3,25\%$) y hembras ($35,04 \pm 3,39\%$). En ninguno de los tratamientos se observó correlación entre el porcentaje de germinación de los conidios y el porcentaje de infección fúngica ($r = -0,21$; $gl = 1$; $P = 0,41$). La falta de correlación entre estos parámetros también fue observada por de Faria *et al.* (1995), al evaluar la patogenicidad de diferentes aislamientos de *M. anisopliae* contra *Deois flavopicta* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) y por Tigano – Milani *et al.* (1995) al evaluar la patogenicidad de varios aislamientos de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson contra *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

El aislamiento *Beauveria bassiana* CEP 147, con un porcentaje de mortalidad acumulada de $69,77 \pm 6,44\%$, resultó ser el más virulento y por consiguiente fue seleccionado para los ensayos de patogenicidad contra adultos de *P. maidis*, *D. kuscheli* y *D. maidis*.

Si bien Gillespie (1984), registró altos valores de mortalidad acumulada (85% - 95%) al inocular al delfácido *Nilaparvata lugens* con *Paecilomyces fumosoroseus* y *P. farinosus*, los resultados obtenidos en este estudio, no permitieron ubicar a los 2 aislamientos nativos de estas especies fúngicas dentro de los más virulentos contra *P. maidis*, debido a que los valores de mortalidad registrados no fueron muy elevados (44,09% y 19,44%, respectivamente).

Considerando la hipótesis de que los aislamientos más virulentos son obtenidos desde los organismos testeados o de especies estrechamente relacionadas (Latch, 1965, 1976; Soares *et al.*, 1983; Poprawski *et al.*, 1985) los resultados preliminares aquí obtenidos no resultan coincidentes, dado que el aislamiento más virulento contra los insectos tratados fue aquel proveniente de adultos de *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae), recolectados sobre plantas de maíz en la provincia de Tucumán.

Evaluación de la patogenicidad del aislamiento fúngico seleccionado

A los 7 días posteriores a la inoculación se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($K = 28,71$; $P < 0,0000$). Tanto *D. kuscheli* (mortalidad de $59,53 \pm 7,9\%$) como *P. maidis* (mortalidad de $54,42 \pm 6,6\%$) fueron significativamente más susceptibles al aislamiento *B. bassiana* CEP 147 que los adultos de *D. maidis*, cuyo porcentaje promedio de mortalidad fue $14,04 \pm 3,9\%$.

A la semana posterior a la inoculación no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad diferencial de acuerdo al sexo de los insectos tratados ($F = 0,50$; $gl = 1$; 46 ; $P = 0,48$). Los machos al igual que las hembras presentaron porcentajes de mortalidad similares, siendo los valores promedio para las tres especies tratadas $31,01 \pm 6,1\%$ en los machos y $37,15 \pm 6,2\%$ en las hembras.

Al concluir los 14 días de observación también se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($K = 22,69$; $P < 0,0000$). *D. kuscheli* y *P. maidis* arrojaron valores de mortalidad acumulada de $73,28 \pm 9,0\%$ y $68,64 \pm 6,7\%$ respectivamente, mientras que para *D. maidis* el valor obtenido fue $49,94 \pm 9,7\%$. Asimismo el tiempo medio de mortalidad registrado para cada una de ellas fue de 6,2, 6,1 y 8,6 días.

También en este período, machos y hembras fueron igualmente afectados por el aislamiento fúngico seleccionado (con promedios de mortalidad de $46,71 \pm 7,7\%$ y $55,05 \pm 6,7\%$ respectivamente) no registrándose diferencias significativas entre los mismos ($F = 0,67$; $gl = 1$; 46 ; $P = 0,42$). Estos resultados no resultan coincidentes con los obtenidos por Abe & Ikegami (2005), en donde machos y hembras adultos de trips (Insecta: Thysanoptera) presentaron una susceptibilidad diferente a la infección con distintos aislamientos de *B. bassiana*.

Si bien transcurridas dos semanas desde la inoculación, *D. maidis* presentó una mortalidad menor que la obtenida para las dos especies de delfácidos, este resultado fue mayor que el registrado por Ibarra - Aparicio *et al.* (2005) al utilizar tres cepas de la misma especie fúngica (8,6% - 22,5%).

Los resultados del test de Kruskal-Wallis y del tiempo medio de mortalidad se presentan en la Tabla 3.

Tratamiento	Mortalidad acumulada		Tiempo medio de mortalidad
	7 días	14 días	
Control	8,33 ± 2,1 a	11,67 ± 2,1 a	-
<i>D. maidis</i>	14,04 ± 3,9 a	49,94 ± 9,7 b	8,6
<i>P. maidis</i>	54,42 ± 6,6 b	68,64 ± 6,7 bc	6,1
<i>D. kuscheli</i>	59,53 ± 7,9 b	73,28 ± 9,0 c	6,2

Tabla 3: Valores de mortalidad porcentual acumulada provocada por *B. bassiana* CEP 147 en las tres especies de insectos tratadas y tiempo medio de mortalidad (TM) de las mismas. Los valores de mortalidad acumulada están expresados en media ± error estándar a los 7 y 14 días posteriores a la inoculación y los de TM en días. Los valores seguidos por la misma combinación de letras no presentaron diferencias significativas para el test de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

A las 24 horas posteriores a la muerte de los insectos tratados, el micelio fúngico comenzó a surgir a través de los espiráculos y las membranas intersegmentales de todo el cuerpo del hospedador. El tiempo de emersión de *B. bassiana* CEP 147 fue similar en las tres especies de insectos. Entre las 48 y las 72 horas posteriores a la muerte, el micelio en etapa de esporulación se encontró cubriendo casi la totalidad de los cadáveres. En este estudio los tiempos de esporulación del *B. bassiana* CEP 147 (2 - 3 días) fueron menores que los registrados por Ibarra - Aparicio *et al.* (2005) (4,7 - 13,8 días). En algunas oportunidades gotas de exudado incoloras fueron observadas sobre el micelio fúngico (Fig. 6).

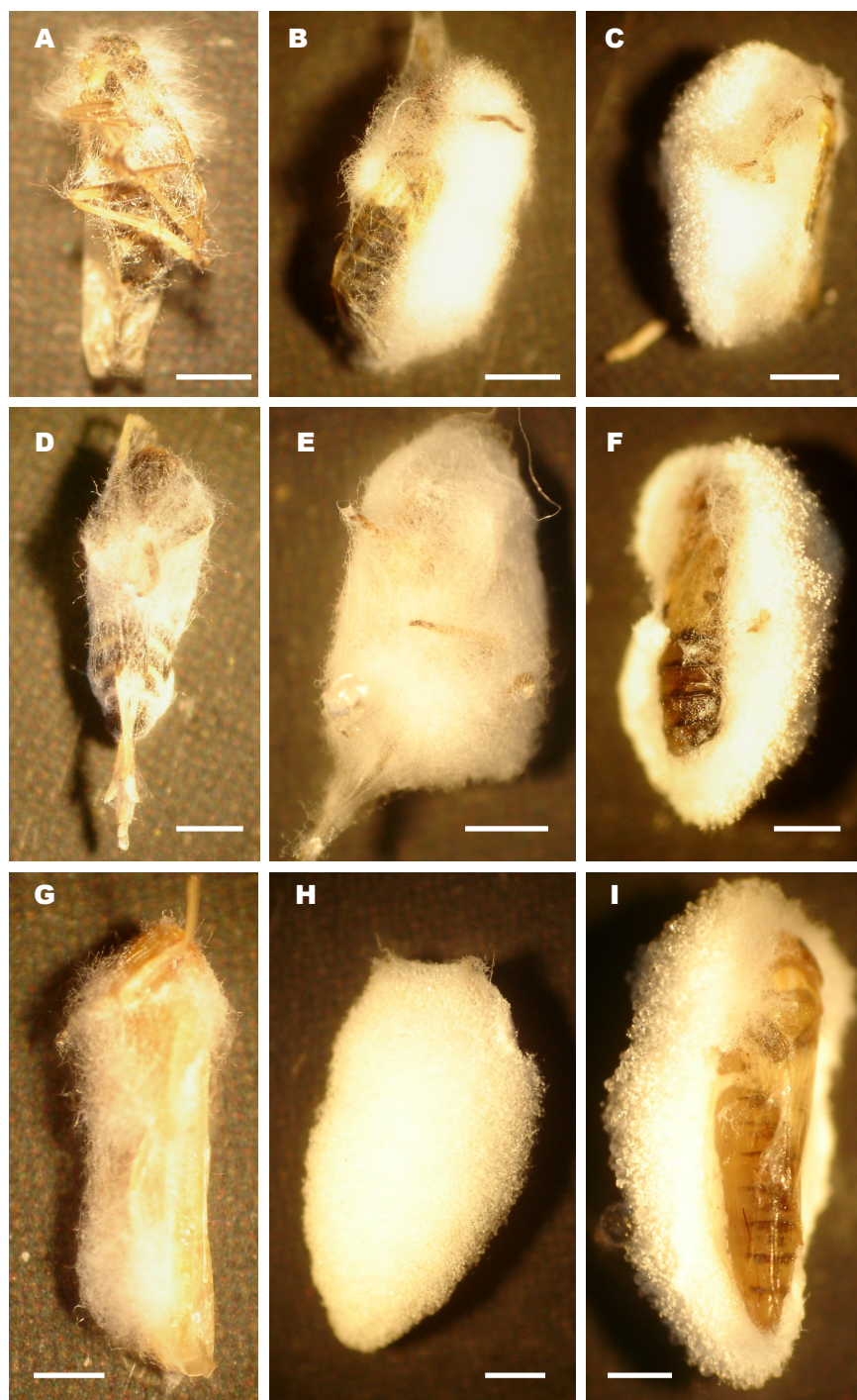


Fig. 6: Emersión y esporulación de *B. bassiana* CEP 174 en las tres especies de insectos inoculadas. *D. kuscheli*: **A:** 24 horas después de la muerte. **B:** 48 horas después de la muerte. **C:** 72 horas después de la muerte. *P. maidis*: **D:** 24 horas después de la muerte. **E:** 48 horas después de la muerte. **F:** 72 horas después de la muerte. *D. maidis*: **G:** 24 horas después de la muerte. **H:** 48 horas después de la muerte. **I:** 72 horas después de la muerte. En todos los casos a las 72 horas posteriores a la muerte de los insectos el micelio se observa abundantemente esporulado. Escalas: 0,6 mm.

Considerando las diferencias en los niveles de mortalidad registrados en las especies tratadas, es interesante destacar el comportamiento de limpieza que exhibió *D. maidis* luego de ser inoculado con la suspensión de conidios. A diferencia de los delfácidos, los cicadélidos inmediatamente luego de ser inoculados, trataron de limpiar su cuerpo deslizando reiteradas veces el tercer par de patas sobre las alas. Este comportamiento particular podría constituir una de las causales de los menores porcentajes de mortalidad registrados en esta especie como consecuencia de una disminución de la cantidad de propágulos infectivos sobre el cuerpo del hospedador. Unos pocos estudios previos describen comportamientos de defensa en insectos en respuesta a los patógenos, generalmente desde una perspectiva inmunológica. Siebeneicher *et al.* (1992) consideran el acicalamiento como un tipo de defensa usada por las hormigas, las cuales están continuamente removiendo de sus cuerpos: bacterias, hongos y otros organismos inductores de enfermedades que se encuentran en el suelo. Asimismo, estudios recientes indican que algunas especies de termitas detectan la presencia de los conidios del hongo patógeno *M. anisopliae* respondiendo con vibraciones corporales (Rosengaus *et al.*, 1999).

En cuanto a la manifestación del entomopatógeno sobre el hospedador, es interesante destacar que 26,2%, 28,2% y 29,7% de los adultos de *D. kuscheli*, *P. maidis* y *D. maidis* respectivamente, muertos durante los 14 días de observación, no presentaron desarrollo externo de micelio. De acuerdo a lo mencionado por Poprawski *et al.* (1999), sólo las cepas que esporulan abundantemente sobre el cadáver de su hospedador tienen potencial de dispersión y reciclaje en el medio ambiente. Por tal motivo, en este estudio, no se realizaron disecciones ni macerados para observar la presencia de cuerpos hifales en el interior de los cadáveres, sino que sólo fueron considerados muertos por infección fúngica aquellos insectos que presentaron desarrollo externo de micelio con una consiguiente abundante esporulación.

En algunos ejemplares de *D. maidis* pudo observarse la melanización del tegumento luego de su muerte, y casualmente fueron los insectos con estos cambios de coloración algunos de los que no desarrollaron micelio externamente (Fig. 7). De acuerdo a Boucias & Pendland (1998), la melanina se forma durante el endurecimiento y oscurecimiento de la cutícula, así como en respuesta a lesiones cuticulares o a la invasión del hemocèle por sustancias extrañas. Recientes estudios demostraron que las fenoloxidasas, enzimas involucradas en la producción de pigmentos melánicos, se encuentran como precursores inactivos denominados profenoloxidasas, los cuales son activados por un sistema de cascada proteolítico. La activación de la cascada por parte de los componentes de la pared celular microbiana, como por ejemplo los β -1,3-glucanos de la pared de las células fúngicas, produce melanina y estimula las actividades de defensa celular que incluyen, entre otras, la adhesión de hemocitos, la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación (Boucias & Pendland, 1998).

En algunos individuos de las tres especies tratadas también pudo observarse el desarrollo de bacterias dentro del cuerpo del hospedador, dándole al mismo una consistencia húmeda y blanda debido a la descomposición de los tejidos. En estos ejemplares el desarrollo externo de micelio fue muy escaso o nulo.



Fig. 7: Hembras de *D. maidis* depositadas en cámara húmeda luego de su muerte. En el extremo superior de la figura se observa un individuo mostrando la melanización del tegumento, con respecto a la coloración normal que presenta el individuo ubicado debajo. Escala: 0,54 mm.

III.4. CONCLUSIONES

Beauveria bassiana CEP 147 fue seleccionado entre 17 aislamientos, por registrar los valores más altos de mortalidad contra *P. maidis*.

Los delfácidos *P. maidis* y *D. kuscheli* fueron similarmente susceptibles a la infección con *B. bassiana* CEP 147 mientras que el cicadélido *D. maidis* mostró ser el menos susceptible.

Tanto a los 7 como a los 14 días posteriores a la inoculación los valores de mortalidad de las especies de delfácidos fueron significativamente mayores que las registradas para el cicadélido. No obstante no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad de infección relacionada con el sexo de los hospedadores.

El tiempo medio de mortalidad registrado para *P. maidis*, *D. kuscheli* y *D. maidis* fue de 6,1, 6,2 y 8,6 días, respectivamente.

En las 3 especies estudiadas, un promedio de 28,3% de los insectos muertos no mostró desarrollo externo de micelio fúngico, lo cual podría atribuirse a mecanismos de defensa utilizados por los mismos o a la interacción con bacterias luego de la muerte del hospedador. Sólo *D. maidis* evidenció una notoria melanización del tegumento al momento de su muerte, lo cual podría estar relacionado con estos mecanismos.

Beauveria bassiana CEP 147 emergió a través de los espiráculos y las membranas intersegmentales en las tres especies de insectos tratadas, en un promedio de 24 horas posteriores a la muerte y entre las 48 y las 72 horas, el micelio esporulado cubrió casi la totalidad de los cadáveres.

Es interesante destacar que si bien el aislamiento de *B. bassiana* seleccionado presentó resultados promisorios en condiciones de laboratorio, se requieren futuros estudios en condiciones de campo que permitan evaluar su accionar contra estas plagas y sus enemigos

naturales, a fin de optimizar la utilización de las especies nativas de hongos entomopatógenos como agentes potenciales de control biológico.

CAPITULO IV. Histopatología de adultos de *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae) causada por los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales).

IV.1. INTRODUCCION

A nivel mundial se han llevado a cabo estudios acerca de los modos de infección y la histopatología ocasionada por algunas especies fúngicas de los órdenes Hypocreales y Entomophthorales, en especies de insectos de importancia económica. Algunas referencias al respecto son Hedlund & Pass (1968) en *Hypera postica* (Coleoptera), Fargues & Vey (1974), Vey & Fargues (1977) y Alee *et al.* (1990) en *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera), Schabel (1978) en *Hylobius pales* (Coleoptera), Pekrul & Grula (1979) en *Heliothis zea* (Lepidoptera), St Leger *et al.* (1988) y Goettel *et al.* (1989) en *Manduca sexta* (Lepidoptera), Mc Cauley *et al.* (1968), Zacharuk (1970a, b, c, d) en tres especies de larvas de Elateridae (Coleoptera) y Vestergaard *et al.* (1999) en *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera).

La bibliografía existente acerca de estudios de interacción entre hongos patógenos y hemípteros Auchenorrhyncha sólo alude a algunas especies de hongos Entomophthorales en representantes de la familia Cicadellidae (Butt *et al.*, 1988; Wraight *et al.*, 1990), no habiéndose efectuado hasta el momento estudios histopatológicos en hemípteros Delphacidae de interés agronómico.

Peregrinus maidis (Hemiptera: Delphacidae) es una especie pantropical reconocida en el mundo por transmitir al maíz, de forma persistente propagativa, cuatro virus diferentes (Tsai & Wilson, 1986; Nault & Ammar, 1989). En la Argentina su presencia fue registrada sobre maíz, sorgo, mijo y citrus en las provincias de Formosa, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Salta, Tucumán y Buenos Aires (Tesón & Remes Lenicov, 1989; Remes Lenicov & Virla, 1999b; Remes Lenicov & Mariani, 2001). Recientemente fue demostrada su acción como vector experimental del virus del Mal de Río Cuarto del maíz, enfermedad endémica de amplia difusión en el área maicera de la Argentina (Virla *et al.*, 2004).

El objetivo del presente capítulo fue detectar los efectos de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* CEP 189 y *Metarhizium anisopliae* CEP 160 en adultos de *Peregrinus maidis* a través de estudios histológicos, mediante el uso de microscopía óptica y electrónica de barrido.

IV.2. MATERIALES Y METODOS**IV.2.1. Estudios de patogenicidad y sintomatología**

Los insectos utilizados provinieron de poblaciones de *P. maidis* mantenidas en invernáculo sobre plantas de maíz sembradas en macetas plásticas y aisladas con jaulas de PET. Sesenta adultos de 10 días de emergidos fueron extraídos desde las jaulas de cría por medio de

aspiradores manuales. Quince machos y 15 hembras fueron inoculados con *B. bassiana* CEP 189 y 15 machos y 15 hembras con *M. anisopliae* CEP 160. Los aislamientos fúngicos fueron obtenidos a partir de hemípteros de la familia Cixiidae, asociados a cultivos de arroz y Cercopidae, recolectados sobre plantas de *Eryngium* sp., respectivamente. Ambas especies fúngicas fueron mantenidas en medio de cultivo agar extracto de malta 2% durante 10 días a 25° C en oscuridad. A partir de estos cultivos, los conidios fueron cosechados y aplicados con un pincel de pelo de marta (previamente esterilizado en autoclave). Los insectos fueron inoculados en grupos de 10 dentro de tubos de ensayo de 10x1 cm y expuestos al inóculo durante 3 minutos. Para cada especie fúngica se realizaron 3 réplicas. Diez machos y 10 hembras sin tratamiento alguno fueron utilizados como control.

La dosis de conidios administrada a cada insecto fue estimada indirectamente mediante el recuento de los propágulos recibidos luego de la inoculación adaptando la metodología descrita por Butt & Goettel (2000). Para tal estimación se inocularon 5 adultos adicionales, con cada uno de los aislamientos, de la manera anteriormente descrita. Los ejemplares fueron colocados individualmente en tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf conteniendo 1ml de Tween 80 (0,01 % v/v) y agitados en vórtex durante 1 min. La cantidad de propágulos contenida en cada una de las suspensiones obtenidas fue cuantificada con el uso de un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y la estimación de la dosis recibida por cada insecto fue calculada promediando los valores registrados. Cada insecto inoculado con *B. bassiana* CEP 189 recibió una dosis promedio de $1,4 \times 10^5$ conidios /ml. (95,5% de germinación *in vitro*), mientras que los que fueron inoculados con *M. anisopliae* CEP 160 recibieron una dosis promedio de $8,5 \times 10^4$ conidios /ml. (100% de germinación *in vitro*).

Luego de ser inoculados 5 hembras y 5 machos por réplica fueron colocados en botellas de PET de 2.250 cc, acondicionadas como se detalló en el capítulo III, e incubados en uno de los bioterios del CEPAVE a $24 \pm 1^\circ$ C, 50% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12:12h luz: oscuridad. Como sustrato para la alimentación de los insectos se utilizaron plántulas de maíz en estado de 3-4 hojas, obtenidas desde cultivos tradicionales sembrados en macetas plásticas conteniendo tierra previamente esterilizada en autoclave tipo Chamberlain (40 minutos a 121° C y 1 atm.). Las plantas fueron colocadas individualmente con sus raíces envueltas en algodón embebido en agua destilada estéril y renovadas cada 3 días (Fig. 1).

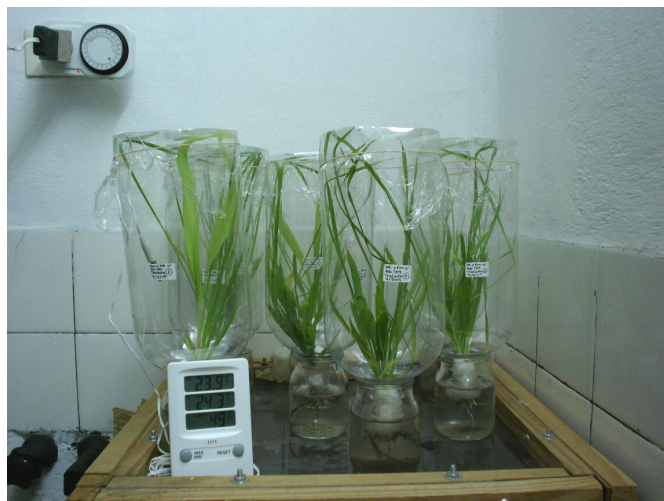


Fig. 1: Condiciones en las que se mantuvieron los insectos inoculados con *B. bassiana* CEP 189 y *M. anisopliae* CEP 160. Bioterio del CEPAVE.

La mortalidad de los insectos y el tiempo de emersión y esporulación del micelio fúngico sobre los cadáveres fueron registrados cada 24 horas durante un total de 10 días. Con los datos de mortalidad diaria se calculó la mortalidad porcentual acumulada y el tiempo medio de mortalidad ($TM = \sum [Días_n \times insecto\ infectado\ muerto_n] / \text{total de insectos infectados muertos}$), utilizando la fórmula citada por Lecuona & Díaz (2001). Las diferencias en los niveles de mortalidad entre los tratamientos, incluyendo los controles, fueron analizadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Fisher de diferencias mínimas significativas (LSD) ($\alpha = 0,05$) (STSC, Statgraphics, 1987); siendo los resultados expresados en tablas y gráficos.

Los insectos muertos fueron removidos diariamente y esterilizados superficialmente bajo las mismas condiciones detalladas en el capítulo III. Luego de ser esterilizados, los cadáveres fueron colocados en cámaras húmedas y mantenidos en incubadora a 25° C a fin de facilitar la emergencia del hongo entomopatógeno. El micelio emergente de los hospedadores fue confirmado por medio de observaciones microscópicas y los insectos muertos infectados con *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron fotografiados bajo microscopio binocular estereoscópico al que se adaptó una cámara fotográfica digital Sony Cyber-shot.

IV.2.2. Estudios histopatológicos

IV.2.2.1. Observación de los eventos de adhesión, germinación y penetración de los conidios fúngicos a través de la cutícula del hospedador

Con la finalidad de observar los eventos de adhesión, germinación y penetración de los conidios a través de la cutícula, los insectos infectados fueron examinados con la utilización de un microscopio electrónico de barrido (Jeol 6360 LV). Previo a la observación se fijaron 2

machos y 2 hembras de *P. maidis* infectados con *B. bassiana* CEP 189 y 2 machos y 2 hembras infectados con *M. anisopliae* CEP 160, a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inoculación. La aplicación del inóculo se realizó de la misma manera que en el ensayo de patogenicidad. Los individuos fueron mantenidos en cápsulas de Petri con papel de filtro humedecido y hojas de maíz, a una temperatura de $24 \pm 1^\circ \text{C}$, humedad de saturación y fotoperíodo de 14 horas de luz. Los insectos adultos fueron fijados en glutaraldehído 2,5% durante 24 horas a 4°C , transferidos a glutaraldehído fresco durante 45 minutos a temperatura ambiente, lavados con una solución de buffer cacodilato 0,1M por 45 minutos, fijados posteriormente en tetroxido de osmio (OsO_4) durante 1 hora a temperatura ambiente, lavados en agua destilada por 10 minutos y deshidratados en una serie ascendente de alcoholes (etanol 10, 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100%) durante 10 minutos en cada uno. Una vez secados por punto crítico fueron bañados en oro y finalmente fotografiados. La metodología utilizada fue adaptada de Becnel (1997).

IV.2.2.2. Observación de los eventos de multiplicación de los hongos entomopatógenos dentro del cuerpo del insecto hospedador

Se inocularon 20 hembras y 20 machos de *P. maidis* con *B. bassiana* CEP 189 y 20 hembras y 20 machos con *M. anisopliae* CEP 160 de la manera descrita anteriormente. Diez machos y 10 hembras fueron mantenidos como control. Dos insectos tratados y un control de cada sexo fueron fijados a intervalos de 24 horas antes de la muerte durante 5 días consecutivos y luego de las 24 y 48 horas posteriores a la muerte. Antes de ser fijados los insectos fueron anestesiados en freezer -20°C durante 1 minuto para extirparles las alas y las patas y de esta manera permitir la mejor penetración del fijador en los tejidos. Los insectos tratados y controles fueron fijados por 24 horas a temperatura ambiente en formol buffer fosfato 10% pH 6.8 (Humason, 1962), deshidratados en una serie creciente de alcoholes: etanol 50, 70, 95% (2 horas en cada uno) y alcohol butílico (7 días) e incluidos en Paraplast®. Los mismos fueron seccionados en forma seriada con micrótomo manual (Reichert), efectuándose cortes sagitales de 5-6 μm de espesor. Por último los cortes fueron coloreados utilizando coloración tricrómica de Masson (Masson, 1928) y el método de metenamina - nitrato de plata de Grocott para hongos (Grocott, 1955). Todos los cortes fueron montados en bálsamo de Canadá natural. Los mismos fueron observados bajo microscopio óptico Olympus (CH 30), fotografiados utilizando una cámara digital Sony Cyber-Shot y luego de ser estudiados, depositados en la colección de cortes histológicos del laboratorio de hongos entomopatógenos del CEPAVE, con su correspondiente número de identificación.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.3.1. Estudios de patogenicidad y sintomatología

Al quinto día posterior a la inoculación con *B. bassiana* CEP 189 y *M. anisopliae* CEP 160 los insectos registraron valores de mortalidad acumulada de 66,7% y 49,7% respectivamente. En este momento se detectó que murieron igual porcentaje de machos que de hembras inoculados con *B. bassiana* (66,7%), mientras que para aquellos insectos tratados con *M. anisopliae*, el porcentaje de hembras muertas por infección fúngica (71,1%) fue mucho mayor que en los machos (28,3%).

Al sexto día posterior a la inoculación, *B. bassiana* ocasionó la muerte de 100% de los machos y 80% de las hembras de *P. maidis* tratados, mientras que en el mismo tiempo los valores de mortalidad registrados en machos y hembras inoculados con *M. anisopliae* fueron 51,7% y 82,2%, respectivamente. Los valores de mortalidad provocados por *B. bassiana* en ese momento fueron los máximos valores alcanzados por esta especie fúngica a lo largo del tratamiento. Mientras que al séptimo día posterior a la inoculación con *M. anisopliae* el porcentaje de machos muertos se incrementó a 60%, valor que se mantuvo hasta concluir el ensayo.

Aunque luego de 10 días posteriores a la inoculación, los valores promedio de mortalidad porcentual acumulada ocasionados por *B. bassiana* ($90 \pm 10\%$) fueron superiores a los registrados para *M. anisopliae* ($71,1 \pm 15,2\%$), no se detectaron diferencias significativas ($F = 1,08$; $gl = 1; 10$; $P = 0,32$).

Proporcionalmente más machos que hembras de *P. maidis* resultaron muertos por la acción de *B. bassiana*, observándose una relación inversa en los insectos tratados con *M. anisopliae*, aunque no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad diferencial relacionada al sexo del hospedador ($F = 0,00$; $gl = 1; 10$; $P = 0,95$), siendo el porcentaje de mortalidad ocasionado por ambos hongos entomopatógenos, igual en hembras ($81,1 \pm 9,9\%$) y machos ($80 \pm 16,3\%$). Durante el ensayo no se registró mortalidad en los controles.

Para *B. bassiana* el tiempo letal medio para machos y hembras fue de 5,1 y 4,8 días, mientras que para *M. anisopliae* fue de 5,9 y 4,9 días respectivamente.

En este ensayo se pudo observar que la mortalidad de *P. maidis* ocasionada por *B. bassiana* CEP 189 y *M. anisopliae* CEP 160 por el método de aplicación tópica de conidios secos, fue mayor a la registrada en los ensayos de patogenicidad utilizando la aspersión como método de inoculación, presentados en el capítulo III. La aplicación tópica de conidios secos de *B. bassiana* CEP 189 sobre los insectos provocó una mortalidad de 90%, mientras que cuando el inóculo fue aplicado por aspersión, la mortalidad de los adultos de *P. maidis* fue de 52,87% a los 7 días posteriores al tratamiento. Resultados similares fueron observados para el aislamiento *M. anisopliae* CEP 160, ya que éste provocó mortalidades de 71% y 26,97% al ser inoculado por aplicación tópica de conidios secos y por aspersión respectivamente. Los resultados demostraron que el tiempo promedio de emersión del micelio de *M. anisopliae*,

principalmente a través de los espiráculos y las membranas intersegmentales de las patas y las antenas del hospedador, fue de $24,0 \pm 0$ horas en los machos y de $34,9 \pm 5,2$ horas en las hembras en concordancia con las $44,0 \pm 4,4$ horas en los machos y las $56,0 \pm 5,9$ horas en las hembras que tardó este aislamiento fúngico en esporular. En este estudio, los tiempos de emersión de *M. anisopliae* fueron más cortos que los obtenidos por Mc Cauley (1968) en larvas de Elateridae (48 a 60 horas después de la muerte), ocurriendo lo contrario con los tiempos de esporulación (24 horas después de la muerte). Al igual que lo observado por este autor, tanto para *B. bassiana* como para *M. anisopliae* se registró también la presencia de gotas de exudado incoloras en toda la superficie esporulada del cuerpo de los cadáveres.

El micelio de *B. bassiana* emergió a través del tegumento del hospedador en un promedio de $34,3 \pm 3,4$ horas en los machos y de $41,5 \pm 4,9$ horas en las hembras. El tiempo promedio de esporulación fue de $48,0 \pm 4,8$ horas en los machos y $61,7 \pm 5,0$ horas en las hembras. Los mayores tiempos de emersión del micelio fúngico en las hembras de *P. maidis* nos hace presumir que podrían deberse a la mayor cantidad nutrientes que se alojan en el tejido graso abdominal, en especial cuando éstas se hallan en estado reproductivo.

Es importante destacar que los insectos infectados no mostraron una sintomatología externa evidente antes de su muerte, reaccionando sólo algo más lentamente a los estímulos mecánicos.

Todos los resultados mencionados hasta el momento se observan en los gráficos 1, 2 y 3 y en la tabla 1. Las fotografías de hembras y machos de *P. maidis* sanos e infectados se presentan en la figura 2.

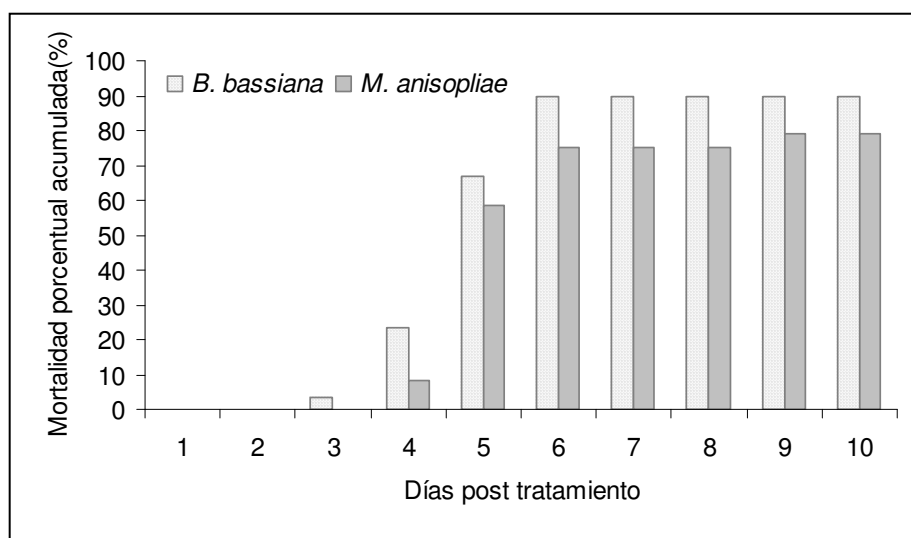


Gráfico 1: Datos de mortalidad porcentual acumulada de adultos de *P. maidis* tratados con *B. bassiana* CEP 189 y *M. anisopliae* CEP 160.

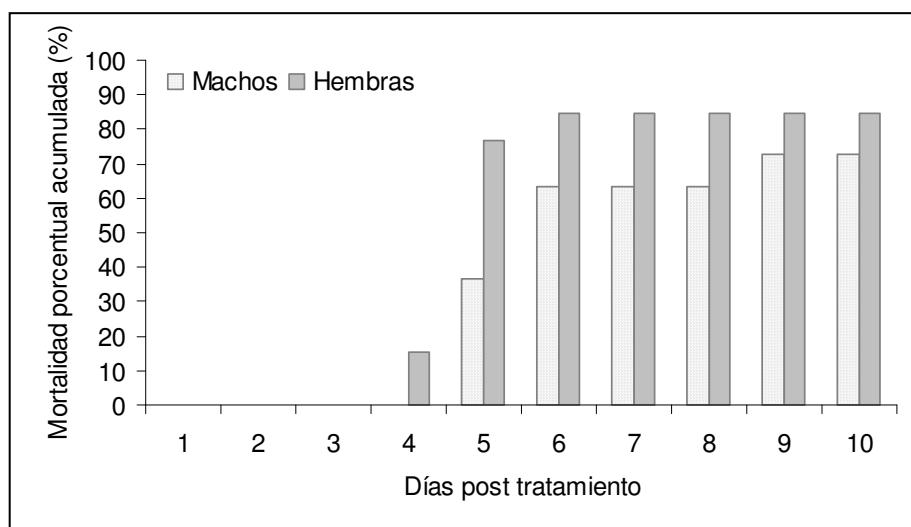


Gráfico 2: Datos de mortalidad porcentual acumulada de machos y hembras de *P. maidis* tratados con *M. anisopliae* CEP 160.

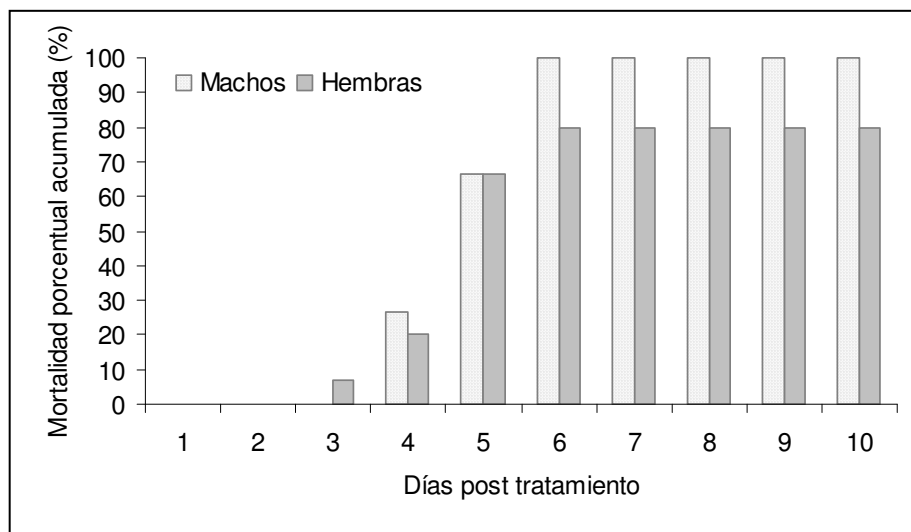


Gráfico 3: Datos de mortalidad porcentual acumulada de machos y hembras de *P. maidis* tratados con *B. bassiana* CEP 189

Aislamiento fúngico	Nº de ♂	TM (d)	Emersión de micelio (h)	Tiempo de esporulación (h)	Nº de ♀	TM (d)	Emersión de micelio (h)	Tiempo de esporulación (h)
<i>M. anisopliae</i> CEP-160	15	5,9	24,0 ± 0	44,0 ± 4,4	15	4,9	34,9 ± 5,2	56,0 ± 5,9
<i>B. bassiana</i> CEP-189	15	5,1	34,3 ± 3,4	48,0 ± 4,8	15	4,8	41,5 ± 4,9	61,7 ± 5,0

Tabla 1: Resultados de tiempo medio de mortalidad (TM) y tiempo de emersión y esporulación del micelio (media ± error estándar) en machos y hembras de *P. maidis* tratados con *M. anisopliae* CEP 160 y *B. bassiana* CEP 189.

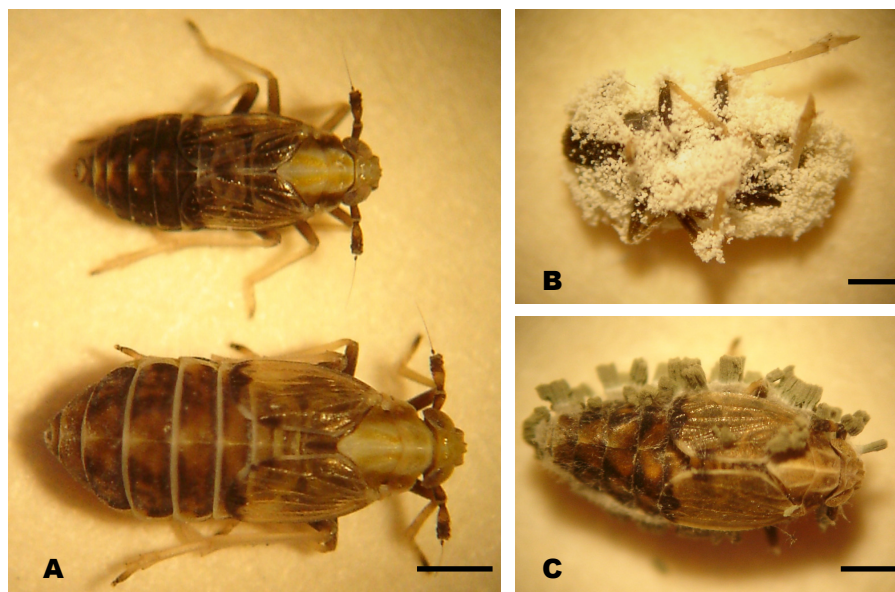


Fig. 2: **A:** *P. maidis*, adultos braquípteros sanos. En el extremo superior de la figura se observa un macho y en el inferior una hembra de mayor tamaño. **B:** Vista ventral de un macho de *P. maidis* mostrando la esporulación de *B. bassiana* CEP 189. **C:** Vista dorsal de una hembra de *P. maidis* mostrando la esporulación de *M. anisopliae* CEP 160. En este último puede observarse la formación de esporodoquios (conidios dispuestos en empalizada). Escalas = 0,5mm.

IV.3.2. Estudios histopatológicos

IV.3.2.1. Observación de los eventos de adhesión, germinación y penetración de los conidios fúngicos a través de la cutícula del hospedador

Tanto en los machos como en las hembras de *P. maidis* infectados con *B. bassiana* CEP 189 y *M. anisopliae* CEP 160, se observó gran cantidad de propágulos retenidos en todas las regiones del cuerpo del hospedador. Los conidios de *B. bassiana* fueron observados en grandes concentraciones principalmente en la región esternal del abdomen, donde se depositaron abundantemente en las zonas cercanas a los pelos cuticulares y las depresiones de los orificios de las glándulas cerosas (Fig. 3 A), entre las omatidias de los ojos compuestos (Fig. 3 B), en el pedicelo de las antenas, retenidos entre los pelos de los sensorios (Fig. 3 C-D) y en las regiones articulares de las patas, principalmente en las articulaciones femoro tibiales y tibio tarsales. Los conidios de *M. anisopliae* se encontraron ubicados en las mismas regiones del cuerpo del hospedador, pero en menores concentraciones. Estos también pudieron observarse congregados en las áreas espiraculares (Fig. 4 A), e incluso dentro del atrio espiracular (Fig. 4 B). Al igual que *B. bassiana* los conidios de *M. anisopliae* se observaron en una elevada densidad en la región esternal del abdomen, cercanos a los poros de las glándulas cerosas (Fig. 4 C).

En este estudio los conidios hidrofóbicos de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* fueron capaces de adherirse a todas las regiones del cuerpo del insecto, principalmente en aquellas conteniendo pelos cuticulares, tal como lo observaron Boucias *et al.* (1988). También de

acuerdo a Boucias & Pendland (1991), los conidios de *B. bassiana* fueron frecuentemente retenidos por estos pelos o estrechamente confinados a los mismos. Mc Cauley *et al.* (1968) y Zacharuk (1970a) informaron que los conidios de *M. anisopliae*, capaces de adherirse a la superficie entera de la cutícula, son fácilmente removidos de la epicutícula lisa de los escleritos expuestos, mientras que permanecen firmemente adheridos en los pliegues intersegmentales protegidos. En este estudio, esto se hizo evidente principalmente en la región ocular, donde no se encontraron conidios en las superficies lisas de las omatidias, pero se observaron grandes acumulaciones en las áreas deprimidas entre ellas. En otras regiones del cuerpo no pudo observarse esto de forma muy evidente, debido a que en esta especie de insecto, abundantes secreciones cerosas cubren la superficie cuticular. Boucias & Pendland, 1983, mencionan a la epicutícula como el sitio inicial de la interacción molecular entre la superficie del conidio y la capa de cera.

Más allá de la elevada concentración de conidios de ambas especies fúngicas observada en todas las regiones del cuerpo del hospedador, fueron escasos los tubos germinativos emitidos durante las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inoculación. Dentro de las 48 horas se observaron tubos germinativos cortos penetrando directamente la cutícula del hospedador en el área de la frente y en las regiones próximas a los pelos cuticulares ubicados en las antenas, las nervaduras alares y los esternos abdominales (Fig. 3 E-F). A las 72 horas, además de la observación de tubos germinativos cortos en algunas de las áreas anteriormente mencionadas, se observó la emisión de tubos germinativos largos y errantes sobre la superficie cuticular por parte de ambas especies fúngicas (Fig. 4 D). En el caso de *B. bassiana* se detectaron tubos germinativos largos y errantes en la región esternal de los primeros segmentos abdominales, donde también se observó la presencia de bacterias baciliformes muy próximas a estos (Fig. 3 G-H). Es de destacar que la germinación sobre la cutícula se evidenció a partir de las 24 horas posteriores a la inoculación, donde la cantidad de conidios germinados fue muy escasa si se compara con los valores de germinación de 100% y 95,5% de *M. anisopliae* CEP 160 y *B. bassiana* CEP 189 respectivamente, obtenidos *in vitro*. Al respecto, Mc Cauley *et al.* (1968) observaron que la mayoría de los conidios de *M. anisopliae* inoculados en larvas de Elateridae germinaron a las 12 horas de incubación, aunque algunos lo hicieron dentro de un período de 24 a 48 horas después de la misma; Vestergaard *et al.* (1999) obtuvieron un 100% de conidios germinados a las 24 horas posteriores a la inoculación de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), mientras que los resultados obtenidos por Schabel (1978) demostraron que la germinación de los conidios de la misma especie fúngica en la cutícula de *Hylobius pales* (Coleoptera: Curculionidae) ocurrió dentro de un período comprendido entre las 35 y las 132 horas posteriores a la inoculación.

En coincidencia con las observaciones de Schabel (1978), todos los conidios germinados sobre *P. maidis*, emitieron un solo tubo desde uno de sus extremos, no habiéndose detectado la germinación bipolar ni la producción de apresorios observada por Mc Cauley *et al.* (1968) y Vestergaard *et al.* (1999).

En *P. maidis*, la vía de penetración de los hongos más frecuentemente observada, fue a través de la cutícula de las regiones externas y cercanas a los pelos cuticulares, aunque se observaron tubos germinativos de *M. anisopliae* penetrando las membranas articulares de los pelos implantados en las nervaduras alares (Fig. 4 E-F). Parece interesante destacar que todo el cuerpo de los insectos se vio cubierto de secreciones cerosas muy abundantes. Mc Cauley (1968), registró la penetración de *M. anisopliae* a través de la cutícula sólida de larvas de Elateridae como método más común de entrada, así como a través de espiráculos y poros de los órganos de los sentidos de forma ocasional. Mientras que los sitios preferenciales de penetración en *F. occidentalis* observados por Vestergaard *et al.* (1999) fueron la cabeza, tórax, abdomen y las partes más gruesas de las alas, dónde los mismos penetraron directamente a través de la cutícula. Los conidios de *B. bassiana* observados por Pekrul & Grula (1979) fueron capaces de penetrar directamente a través del integumento como así también vía sistema respiratorio, observándose conidios atrapados dentro de los espiráculos. Estos mismos autores observaron la presencia de un halo circular claro alrededor de los tubos germinativos en los puntos de penetración del hongo en la cutícula, lo cual no se hizo evidente en nuestras observaciones.

Los datos surgidos del presente estudio permiten resaltar la limitada capacidad de invasión del patógeno y la presencia de microorganismos sobre la cutícula de *P. maidis*. De acuerdo a Kerwin (1984), Smith & Grula (1981) y St Leger (1991) para algunos sistemas, el fracaso del hongo al invadir la cutícula del insecto ha sido atribuido a la presencia de compuestos inhibitorios tales como fenoles, quinonas y lípidos sobre la superficie de ésta. Los trabajos de Schabel (1976, 1978), Hubner (1958) y Walstad *et al.* (1970), a su vez sugieren la existencia de una antibiosis ejercida por la microbiota existente sobre la cutícula de los hospedantes, formada principalmente por otros hongos y bacterias.

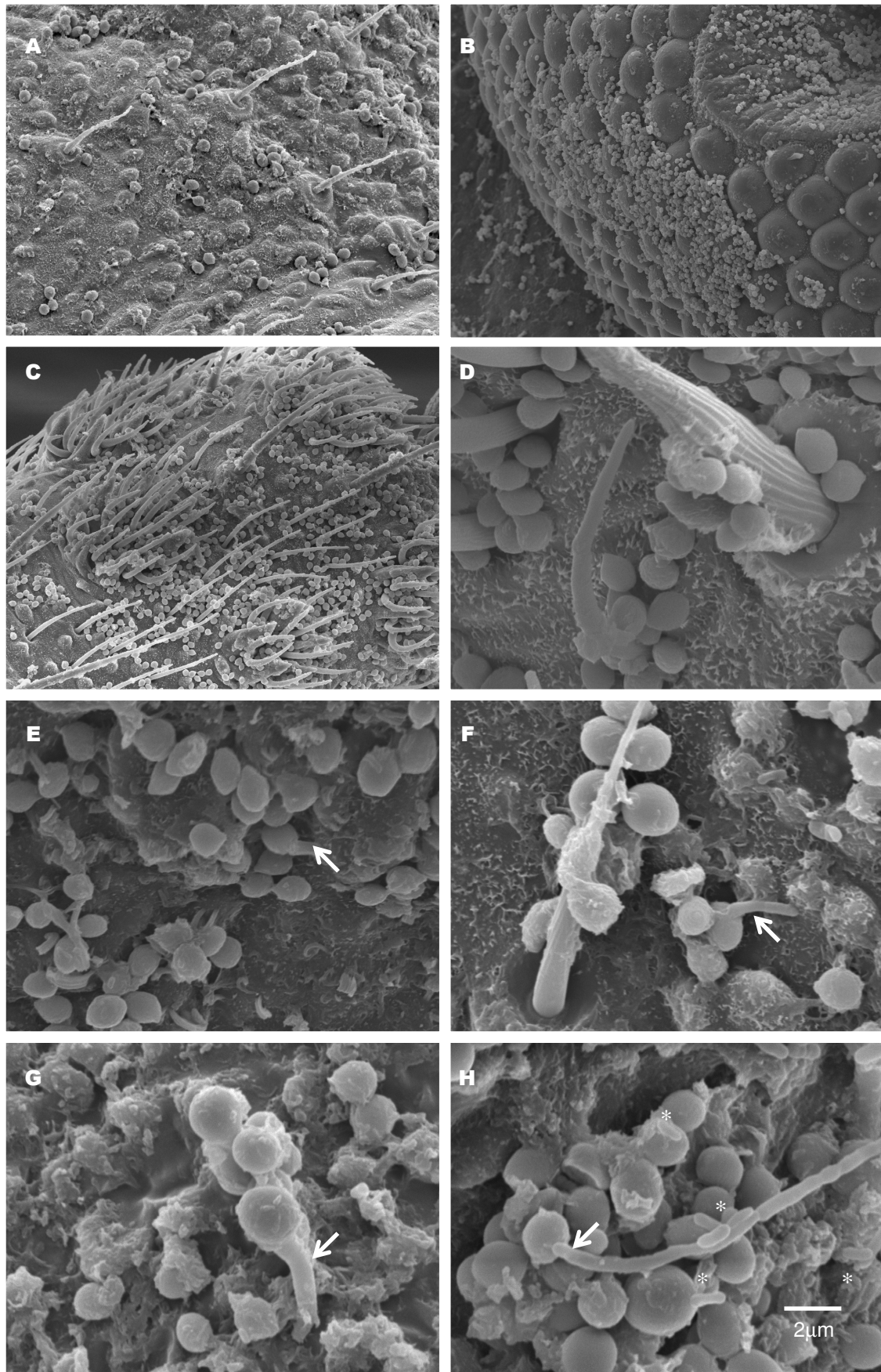


Fig. 3: Fotografías de microscopía electrónica de barrido mostrando la infección de hembras de *P. maidis* con *B. bassiana* CEP 189. **A:** Conidios dispersos entre los pelos cuticulares de la región externa del abdomen (24 h post inoculación). **B:** Conidios dispuestos entre las omatidias de un ojo compuesto (72 h).

C: Conidios retenidos entre los sensores del pedicelo de la antena (24 h). **D:** Detalle de los conidios ubicados entre los pelos de los sensores de las antenas (48 h) **E:** Conidios germinando en la región frontal (24 h). **F:** Conidios adheridos a un pelo cuticular de la frente. A la derecha del mismo puede observarse la emisión de un tubo germinativo (72 h). **G:** Emisión de un tubo germinativo en la región esternal de los primeros segmentos abdominales (72 h). **H:** Conidio emitiendo un tubo germinativo errante, asociado al cual se observan bacterias baciliformes (72 h). Las flechas indican los tubos germinativos y los asteriscos (*) la presencia de bacterias baciliformes asociadas a los mismos.

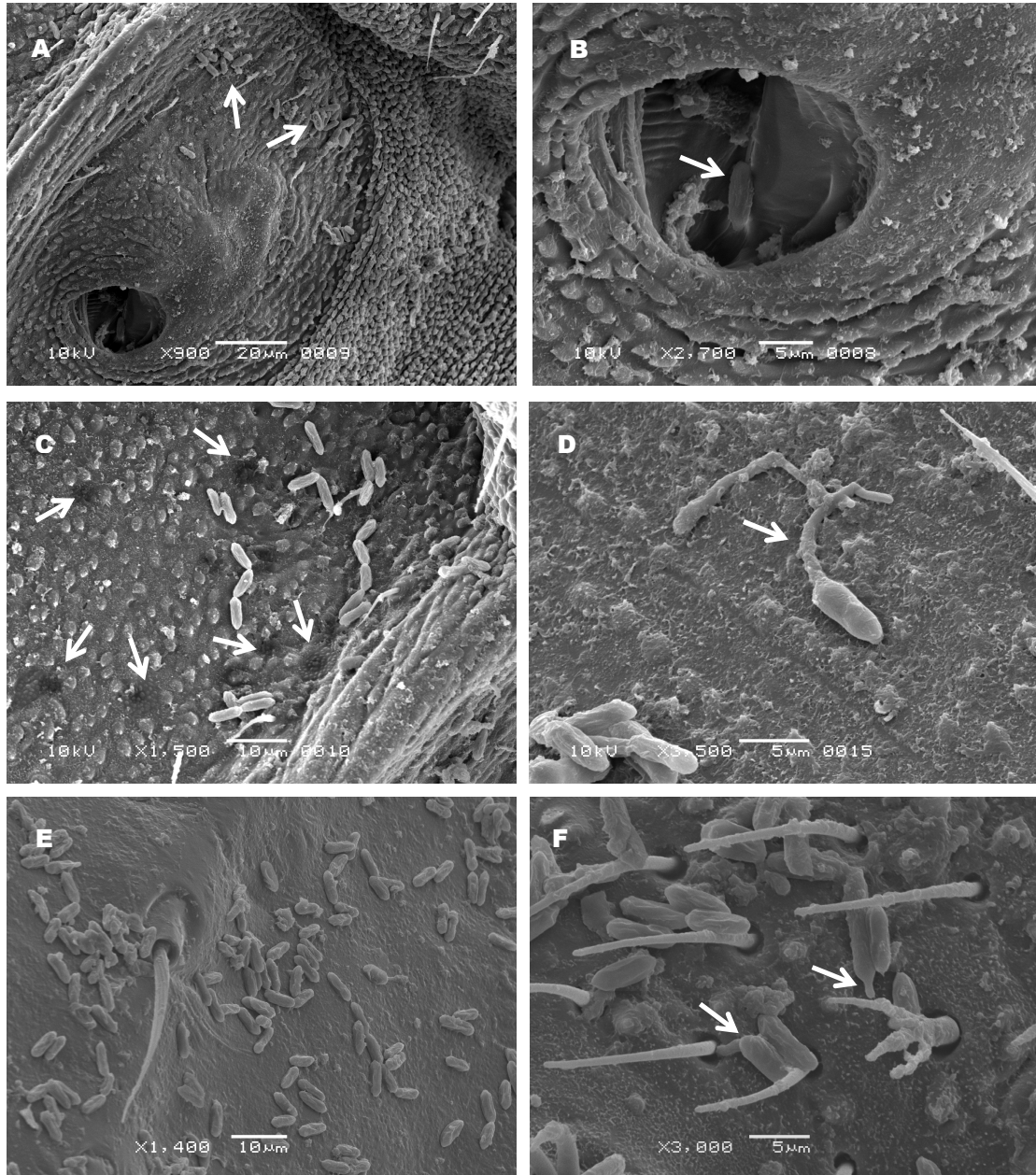


Fig. 4: Fotografías de microscopía electrónica de barrido mostrando la infección de hembras de *P. maidis* con *M. anisopliae* CEP 160. **A:** Conidios dispersos en el área espiracular de los primeros segmentos abdominales (48 h post inoculación), la flecha indica la presencia de un conidio dentro del atrio espiracular. **B:** Detalle de un conidio ubicado en el atrio espiracular. **C:** Conidios dispersos en la región esternal del abdomen, próximos a las depresiones de los orificios de las glándulas cerosas indicados por las flechas (48 h). **D:** Conidio emitiendo un tubo germinativo errante con ramificaciones laterales en la región esternal del abdomen (72 h). **E:** Conidios dispuestos en las áreas próximas a lo pelos de las nervaduras alares (24 h). **F:** Tubos germinativos penetrando a través de los orificios de los pelos cuticulares del ala (24h).

IV.3.2.2. Observación de los eventos de multiplicación de los hongos entomopatógenos dentro del cuerpo del insecto hospedador

Se observó que la coloración Tricrómica de Masson fue muy útil debido a que permitió identificar perfectamente cada uno de los tejidos del insecto hospedador y tener un panorama general de los mismos (Fig. 5), mientras que la coloración de Grocott (Fig. 7 y 8) fue una muy buena opción para resaltar la presencia de hifas y cuerpos hifales, los cuales se tiñeron de color castaño a negro en contraposición a la coloración verde que adoptaron todos los tejidos del insecto.

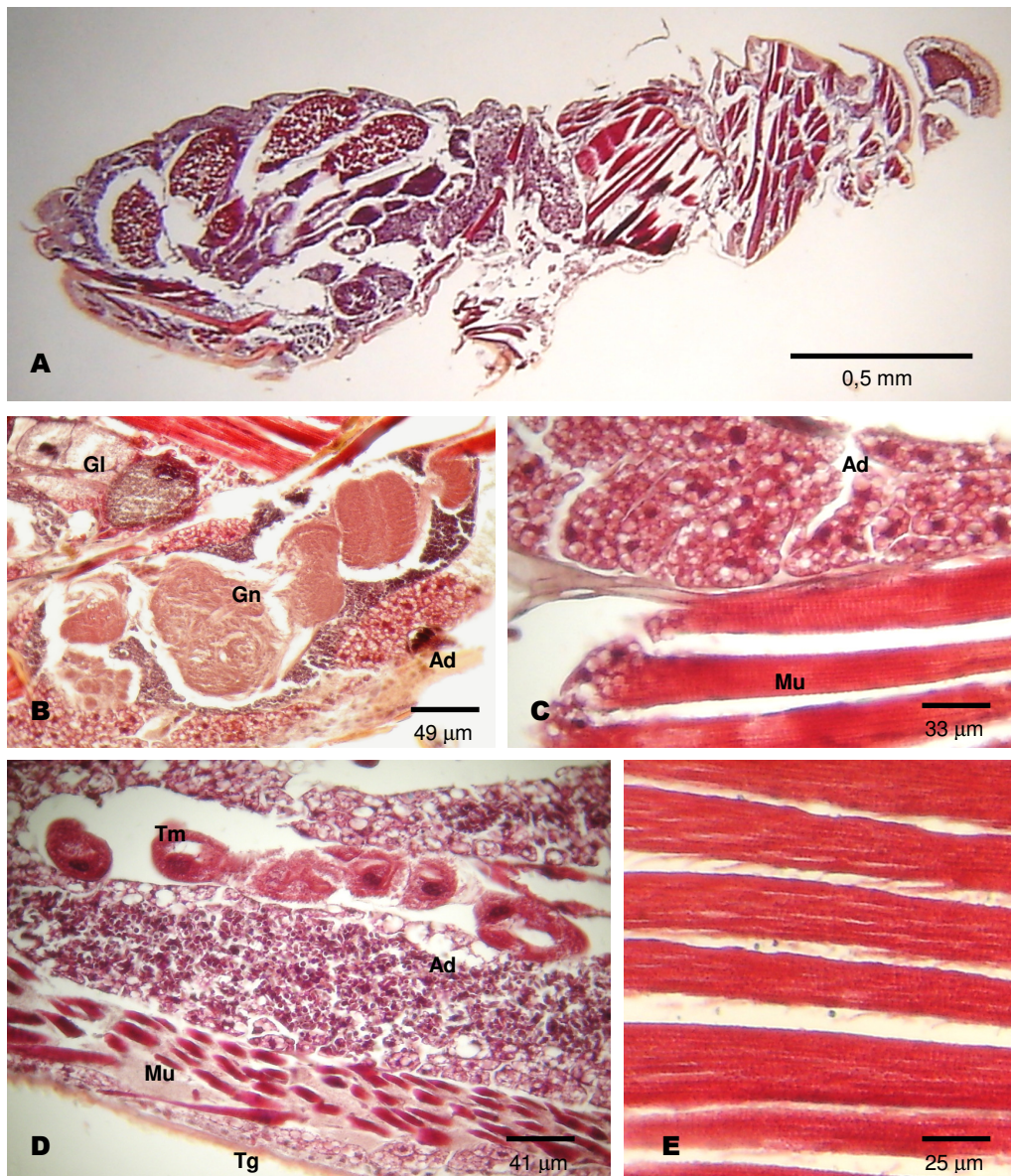


Fig. 5: **A:** Cortes sagitales de una hembra sana de *P. maidis* teñidos con coloración Tricrómica de Masson. **B:** Detalle de los ganglios nerviosos torácicos (Gn), glándulas (Gl) y tejido adiposo (Ad). **C:** Tejidos adiposo y muscular (Mu) en la región del tórax. **D:** Tegumento (Tg), tejido adiposo, muscular y túbulos de Malpighi (Tm). **E:** Detalle de la musculatura estriada del vuelo.

En los eventos de colonización pudo evidenciarse la formación y multiplicación de cuerpos hifales de ambas especies dentro del cuerpo del hospedador, los mismos fueron formados por brotación de células preexistentes de acuerdo a lo descrito por Madelin (1963).

En los cortes de *P. maidis* tratados con *M. anisopliae* CEP 160 el hongo comenzó a visualizarse al cuarto día posterior a la inoculación, momento en el cual se observó la presencia de hifas cortas en el hemocele de machos y hembras. Al quinto día posterior al tratamiento se siguieron observando hifas cortas de 2,48 μm de ancho ($N = 25$) en algunos casos ramificadas y cercanas a los túbulos de Malpighi. Al sexto día posterior a la inoculación todo el cuerpo se encontró invadido por hifas. El tejido más afectado fue el adiposo. El ancho de las hifas fue diferente de acuerdo al tejido invadido: tegumentario: 3 μm , graso y muscular: 4 μm (Fig. 6 A), glandular: 2,5 μm ($N = 25$) (Fig. 6 B-C), lumen del tracto digestivo y cavidades del sistema reproductivo: 1 - 1,5 μm de diámetro ($N = 25$). En el tejido muscular se observaron hifas y cuerpos hifales ramificados, estos últimos con un gran desarrollo de vacuolas. En este momento se observó también la presencia de hifas en la región cefálica, cercanas al pedúnculo ocular (Fig. 6 D) y atravesando el epitelio a nivel del abdomen. Al séptimo día se observó de forma muy notoria la diferencia entre los anchos de las hifas localizadas en el hemocele o las cavidades con respecto a las del tejido adiposo, siendo las primeras mucho más delgadas. Se observaron hifas en las cavidades digestivas, ovariolas, túbulos de Malpighi y penetrando a través del tegumento del abdomen, observándose diferencias en los especímenes evaluados.

A las 24 horas posteriores a la muerte la totalidad de los tejidos del hospedador fueron invadidos por hifas y cuerpos hifales, ubicándose la mayor concentración de los mismos en los tejidos graso y muscular. En este momento también se observó la invasión de los ganglios cefálicos por parte de hifas delgadas. A las 48 horas las hifas y cuerpos hifales invadieron todos los tejidos, observándose en las hembras la penetración en los oocitos en desarrollo.

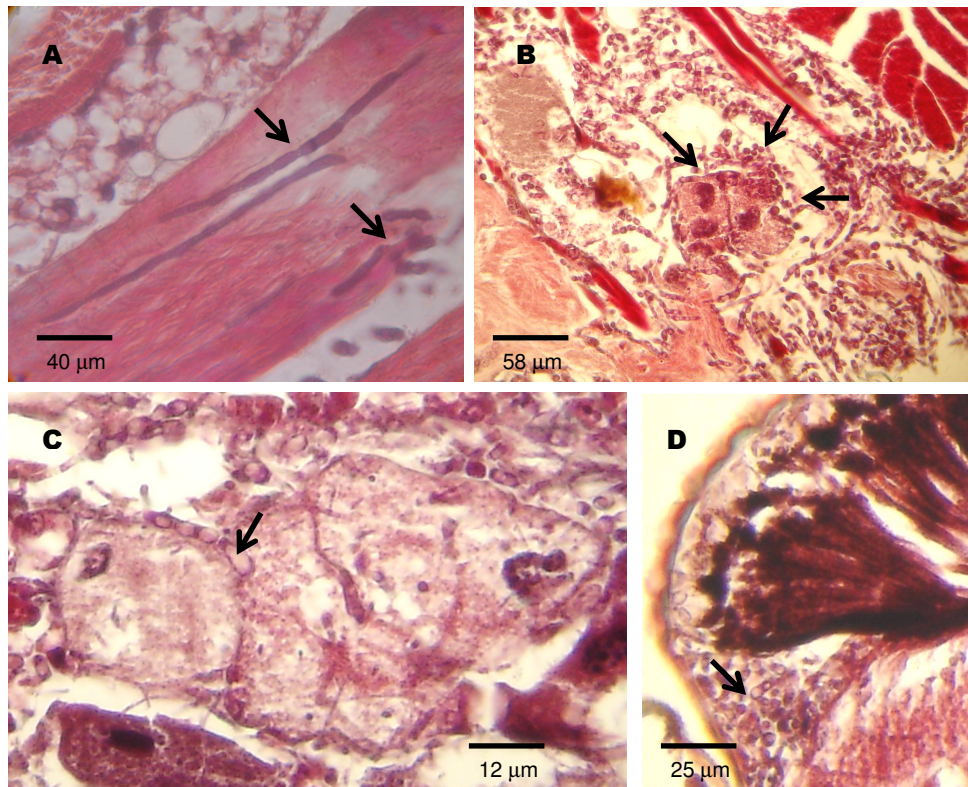


Fig. 6: Cortes sagitales de una hembra de *P. maidis* al sexto día posterior a la inoculación con *M. anisopliae* CEP 160. Coloración Tricrómica de Masson. Las flechas indican: **A:** Hifas invadiendo las fibras musculares del tórax. **B:** Cuerpos hifales rodeando y penetrando el tejido glandular. **C:** Detalle de cuerpos hifales invadiendo las glándulas ubicadas en el tórax. **D:** cuerpos hifales en el área ocular.

Las hifas de *B. bassiana* CEP 189 comenzaron a visualizarse dentro del cuerpo de *P. maidis* al quinto día posterior a la inoculación, detectándose en el tórax y abdomen de machos y hembras. Se observaron hifas cortas, tabicadas, no ramificadas, con presencia de algunas vacuolas pequeñas dispersas en el hemocoele. Tanto en machos como en hembras la mayor concentración de hifas se detectó en la región terminal del abdomen, próximas al tejido graso.

En los machos, a las 24 horas *post-mortem* se observaron cuerpos hifales gruesos, con grandes vacuolas y ramificados en todo el cuerpo (Fig. 7 A). Los mismos se observaron entre los tejidos y en las cavidades digestivas. También se detectaron hifas delgadas en musculatura torácica (Fig. 7 B), glándulas (Fig. 7 C), tejido nervioso (Fig. 7 D), gónadas (Fig. 7 E), túbulos de Malpighi (Fig. 7 F) y tráqueas (Fig. 7 G).

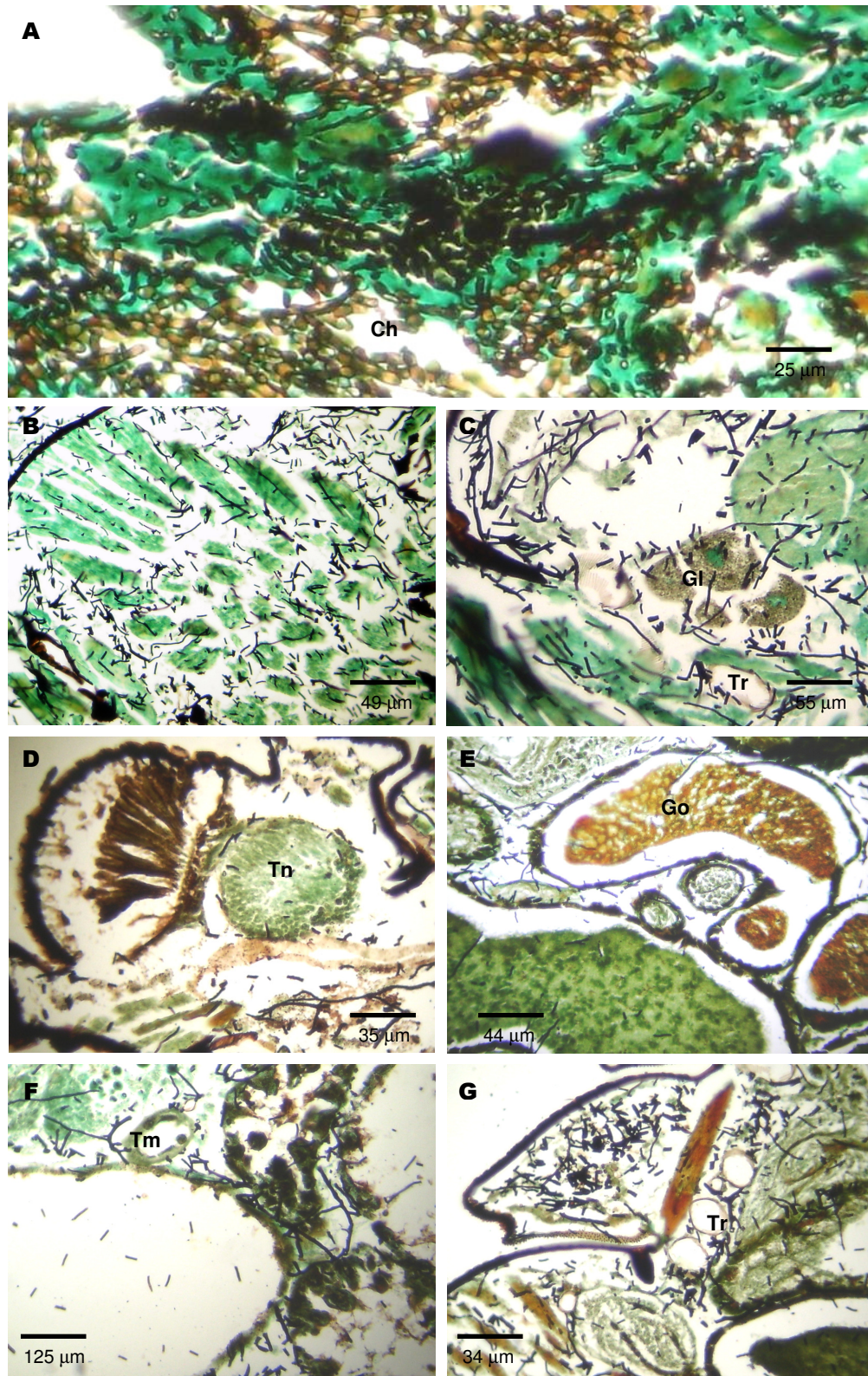


Fig.7: Cortes sagitales de machos de *P. maidis*, infectados con *B. bassiana* CEP 189, a las 24 horas posteriores a su muerte. Coloración Grocott. **A:** Detalle de los cuerpos hifales (Ch) en la musculatura torácica, donde se observa el contraste logrado con esta coloración. Los cuerpos hifales se encuentran teñidos de color marrón, mostrando las áreas vacuoladas de un color más claro. **B:** Hifas invadiendo la musculatura del tórax. **C:** Hifas en la región de las glándulas (Gl). **D:** Tejido nervioso (Tn) invadido por hifas cortas. **E:** Hifas delgadas penetrando las gónadas (Go) en desarrollo. **F:** Hifas delgadas y ramificadas cercanas a los túbulos de Malpighi (Tm) e hifas cortas en cavidades. **G:** Hifas ramificadas alrededor de tubos traquéales (Tr) en sección transversal.

En las hembras, a las 24 horas posteriores a su muerte, se observaron hifas ramificadas en la región abdominal penetrando las paredes de las ovariolas y disponiéndose cercanas a los oocitos en desarrollo y a las tráqueas (Fig. 8 A-B). También se observaron hifas delgadas y cuerpos hifales gruesos invadiendo el tejido graso, el muscular y el nervioso. En los ganglios cefálicos se registró la presencia de hifas delgadas y ramificadas, mientras que en el abdomen se detectaron hifas dispuestas paralelamente al tegumento. A las 48 horas *post-mortem*, la mayor densidad de hifas ramificadas y entrecruzadas se registró en la región abdominal, donde la invasión del sistema reproductivo fue muy evidente (Fig. 8 C-D). La musculatura del vuelo también se observó ampliamente afectada, mostrando la disgregación de sus haces musculares (Fig. 8 E-F). Hifas de las mismas características ocuparon también la región cefálica y se visualizaron atravesando el tegumento en la región abdominal. Por debajo del epitelio las hifas se dispusieron paralelas al mismo y en algunos casos se observaron ramificadas. En cuanto a los diámetros se diferenciaron hifas gruesas, de un promedio de 2,8 μm de ancho, y delgadas de un promedio de 1 μm (N = 25). En este estado avanzado de infección se observó a las hifas penetrar las paredes traqueales y emerger a través de los espiráculos.

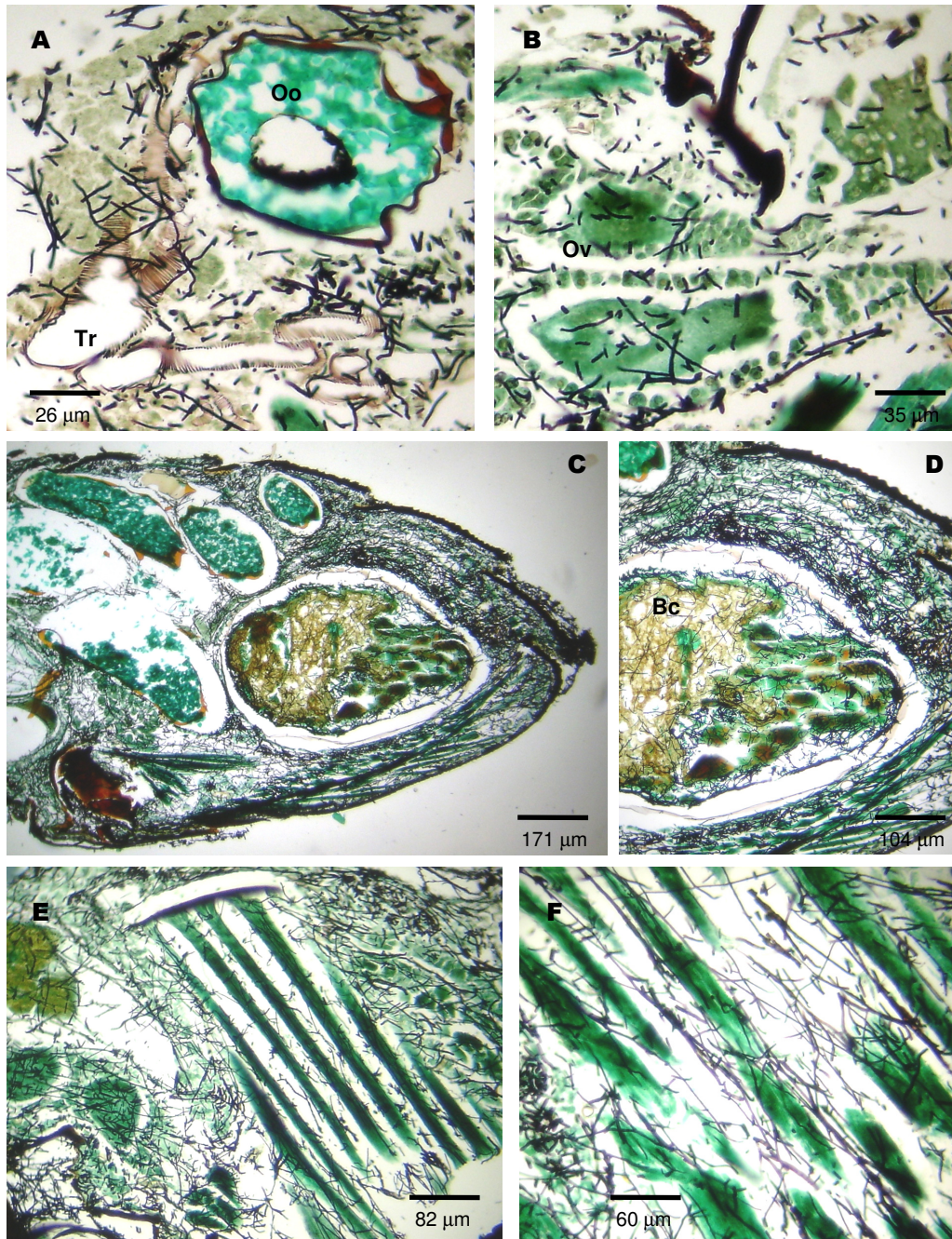


Fig. 8: Cortes sagitales de hembras de *P. maidis*, infectadas con *B. bassiana* CEP 189 (Fig. A-B: 24 h posteriores a su muerte. Fig. C-F: 48 h posteriores a su muerte). Coloración Grocott. **A:** Hifas cercanas a los oocitos maduros (Oo) y atravesando las paredes de las tráqueas (Tr). **B:** Hifas atravesando las paredes de las ovariolas (Ov) e invadiendo los oocitos en desarrollo. **C:** Hifas ramificadas ocupando la totalidad del abdomen del huésped, afectando severamente el sistema reproductivo de la misma. **D:** Detalle de la invasión de la bolsa copulatríz (Bc) por hifas fúngicas. **E:** Hifas de *B. bassiana* en la región torácica del huésped. Se puede observar la invasión del tejido muscular del vuelo. **F:** Detalle de la lisis de los haces de fibras musculares provocada por la acción fúngica.

En ninguno de los cortes histológicos observados en este estudio se detectaron los puntos de penetración de los tubos germinativos ni reacciones de defensa celular asociadas a éstos, tal como lo observaran Fargues & Remaudiere (1977) y Vey & Fargues (1977). No obstante, Hung *et al.* (1993) observaron que ante aislamientos hipervirulentos de algunas especies fúngicas, los

hospedadores fueron incapaces de formar los típicos nódulos para impedir el desarrollo del hongo. Hou & Chang (1985) a su vez mencionan el exitoso desarrollo de *B. bassiana* dentro del hospedador basado en la simple superación de la respuesta de los hemocitos que, según Hung & Boucias (1992), se reducen drásticamente tres días después de la infección. También se han identificado sustancias inmunodepresivas producidas por *M. anisopliae*, tales como la toxina destruxina E, que inhiben la formación de nódulos por parálisis de hemocitos (Huxham *et al.*, 1989 y Cerenius *et al.*, 1990).

En las primeras etapas del desarrollo de la infección fúngica, registradas en el presente estudio, ocurrieron amplias variaciones en la longitud, forma y especialmente la vacuolización de los cuerpos hifales, tal como fuera observado por Mc Cauley (1968), donde el mismo autor atribuye esta variación a las diferencias en la cantidad y calidad de nutrientes disponibles para el hongo. Esto explicaría el hecho de que las hifas dentro del lumen del tracto digestivo y otras cavidades, donde existe limitación en la disponibilidad de nutrientes, exhibieran diámetros menores a los alcanzados por aquellas ubicadas dentro de los diferentes tejidos y órganos.

En el presente estudio se observó que las mayores densidades de hifas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* se encontraron dispuestas en el tejido graso de la región abdominal y en la musculatura esquelética del vuelo. Esta localización resulta coincidente con la observada por Hedlund & Pass (1968), Pekrul & Grula (1979) y Mc Cauley (1968) quienes muestran que ambas especies fúngicas, invaden secuencialmente el tejido graso, seguido por el muscular y los túbulos de Malpighi.

IV.4. CONCLUSIONES

La mortalidad de adultos de *P. maidis* ocasionada por *Metarhizium anisopliae* CEP 160 y *B. bassiana* CEP 189, luego de 10 días posteriores a la inoculación, fue de 70% a 90% respectivamente.

El 50% de los insectos infectados con *M. anisopliae* y *B. bassiana* murió entre los 5,4 y 4,9 días posteriores a la infección, respectivamente.

El tiempo promedio de emersión del micelio de *M. anisopliae* fue de $24,0 \pm 0$ horas en los machos y de $34,9 \pm 5,2$ horas en las hembras. Siendo los tiempos de esporulación de $44,0 \pm 4,4$ horas y $56,0 \pm 5,9$ horas, respectivamente.

El tiempo promedio de emersión del micelio de *B. bassiana* fue de $34,3 \pm 3,4$ horas en los machos y de $41,5 \pm 4,9$ horas en las hembras. Mientras que el tiempo promedio de esporulación fue de $48,0 \pm 4,8$ horas y $61,7 \pm 5,0$ horas, respectivamente.

El micelio de ambas especies fúngicas surgió principalmente a través de los espiráculos y las membranas intersegmentales de las patas y las antenas del hospedador.

La única sintomatología externa evidenciada en los insectos tratados, antes de su muerte, fue la disminución de la velocidad de reacción ante estímulos mecánicos.

Ambas especies fúngicas accionaron de forma similar durante los eventos de adhesión y colonización de los tejidos del hospedador.

Los conidios hidrofóbicos de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* fueron capaces de adherirse a todas las regiones del cuerpo del insecto, principalmente a aquellas conteniendo pelos cuticulares.

En asociación a los propágulos infectivos, sobre la superficie corporal del hospedador, se registró la presencia de bacterias baciliformes.

Dentro de las 72 horas posteriores a la inoculación, los conidios germinados fueron muy escasos en comparación a los valores obtenidos *in vitro* para ambas especies fúngicas.

La presencia de microorganismos sobre la cutícula de *P. maidis* permite plantear la hipótesis de una antibiosis ejercida contra el hongo entomopatógeno, como uno de los factores limitantes de la capacidad de invasión del mismo.

Las áreas propicias para la germinación fueron las esternales, próximas a los pelos sensitivos y a los poros de las glándulas cerosas.

Todos los conidios germinados sobre *P. maidis*, emitieron un solo tubo desde uno de sus extremos, no detectándose la germinación bipolar ni la producción de apresorios.

La vía de penetración de los hongos entomopatógenos más frecuentemente observada fue directamente a través de la cutícula del insecto, aunque se detectó la penetración de los tubos germinativos a través de los orificios de los pelos cuticulares.

En los eventos de colonización pudo evidenciarse la formación y multiplicación de cuerpos hifales de ambas especies dentro del cuerpo del hospedador, los mismos fueron formados por brotación de células preexistentes.

Los cuerpos hifales de *M. anisopliae* comenzaron a evidenciarse dentro del hospedador al cuarto día posterior a la infección, invadiendo la totalidad de sus tejidos hacia el sexto día; mientras que *B. bassiana* se evidenció por primera vez al quinto día posterior a la inoculación, en un estado muy avanzado de desarrollo.

Las mayores densidades de hifas se encontraron dispuestas en el tejido graso y en la musculatura esquelética del vuelo, dónde la lisis de los haces musculares fue muy evidente.

En ninguno de los cortes histológicos observados en este estudio se detectaron los puntos de penetración de los tubos germinativos ni reacciones de defensa celular asociadas a los mismos.

CAPITULO V. Estacionalidad y prevalencia de hongos patógenos de hemipteros Auchenorrhyncha asociados a cultivos de arroz.

V.1. INTRODUCCION

El arroz es único entre los mayores cultivos alimenticios del mundo por sus extensos y variados usos y su adaptabilidad a un amplio rango de condiciones climáticas, edáficas y culturales. En América del Sur, como fuera mencionado anteriormente, los principales exportadores de arroz son la Argentina y Uruguay.

En el mundo se conocen más de 70 especies de insectos plaga de estos cultivos y al menos 20 de ellas pueden afectar seriamente su producción (Mikkelsen & Datta, 1991). El control de los insectos plaga ha dependido primariamente de la aplicación de insecticidas químicos, pero debido a las muchas desventajas de los mismos, el control biológico se ha constituido en una alternativa adecuada y tendiente a disminuir el riesgo de contaminación ambiental. En los agroecosistemas del arroz, existen distintos grupos de organismos entomopatógenos que pueden suprimir de forma natural las plagas de insectos (Rice & Choo, 2000). Entre ellos se destacan los hongos Hypocreales y Entomophthorales, aunque dentro del primer grupo, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* parecen ser los más exitosos por lo sencillo de su producción masiva, almacenamiento, virulencia y fácil aplicación (Rice & Choo, 2000).

Entre los Hemiptera Auchenorrhyncha, los Fulgoromorpha son considerados como una de las plagas más importantes en las principales regiones arroceras del mundo (Wilson & Claridge, 1991). Algunos ejemplos son, *Nilaparvata lugens* (Stål), *Sogatella furcifera* (Horváth) y *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Delphacidae) en Estados Unidos y Asia (Rice & Choo, 2000) y *Tagosodes orizicolus* (Muir) y *T. cubanus* (Crawford) en América Central y del Sur (Wilson & Claridge, 1991; Vivas & Clavijo, 2000).

Si bien no se conocen especies de Cixiidae como plagas de arroz, la abundancia y frecuencia relativa de especímenes correspondientes a esta familia de Auchenorrhyncha, motivó el estudio taxonómico identificándolos como pertenecientes al género *Oliarus* Stål. Representantes de este género son frecuentemente encontrados en cultivos de arroz, así como también sobre caña de azúcar, algodón, tomate, maíz, soja, berenjena, zanahoria, arvejas, espárragos, apio, girasol, alfalfa y pasturas, entre otras (Mead & Kramer, 1982). En la Argentina el género *Oliarus* está representado por una especie, *O. dimidiatus* Berg (1879), de la cual, hasta el presente, sólo se cuenta con la descripción original y algunas observaciones referidas a los sitios de recolección (Metcalf, 1936).

La presencia de *O. dimidiatus* en cultivares de arroz implantados en un área experimental de la provincia de Buenos Aires y el hallazgo de individuos con infecciones fúngicas evidentes, permitió iniciar estudios de prospección, caracterización y seguimiento de la estacionalidad y prevalencia de las especies de hongos patógenos asociadas a este insecto.

V.2. MATERIALES Y METODOS

V.2.1. Estudios de campo:

Se efectuaron prospecciones en áreas arroceras ubicadas en la ciudad de Mercedes, provincia de Corrientes. Los muestreos se realizaron en los establecimientos “Itá Caabó” (LAT: 29° 17′ 50,0″ S - LONG: 57° 43′ 53,7″ O) y “El Rocío” (LAT: 29° 05′ 55,1″ S - LONG: 57° 47′ 27,3″ O) mediante la utilización de red entomológica.

Los estudios sistematizados de estacionalidad y prevalencia de hongos patógenos de *O. dimidiatus* fueron llevados a cabo en cultivos implantados en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (LAT: 34° 52′ S - LONG: 57° 58′ O). Los muestreos fueron realizados durante dos años consecutivos en dos cultivos implantados en áreas espaciales diferentes (debido a la necesidad de rotación por el lavado de nutrientes que produce la anegación del terreno). Para ambos ciclos en los meses de septiembre se aplicó Glifosato® como herbicida a los fines de preparar el suelo para el arado. En los meses de octubre se produjo el sembrado del arroz (variedades de líneas segregadas), el cual fue inundado desde mediados de diciembre hasta fines de marzo.

El primer lote estudiado (campana 2004/05) estuvo conformado por un área de 7.575 m². La prospección de la población de *Oliarus dimidiatus* comenzó a mediados de febrero de 2005, cuando las plantas de arroz alcanzaron una altura de aproximadamente 60 cm (estado fenológico reproductivo). Los muestreos fueron efectuados a lo largo de todo el perímetro del área implantada (revisando las plantas de arroz y las malezas aledañas), entre las 10:00 y las 12:00 horas, con una frecuencia de dos veces por semana durante los meses de febrero, marzo y abril y cada 15 días el resto del año.

El segundo lote en estudio (campana 2005/06) estuvo conformado por un área de 8.250 m² y en él, la prospección de los insectos comenzó a principios de enero de 2006, momento en el cual las plantas de arroz presentaron una altura de aproximadamente 40 cm (estado fenológico vegetativo). Al igual que para el cultivo anterior los muestreos se efectuaron a lo largo de todo el perímetro del área implantada, aunque en este año los mismos fueron efectuados con una frecuencia semanal.

Las capturas sin reposición fueron efectuadas con la utilización de aspiradores manuales y la totalidad de los insectos recolectados durante el período febrero de 2005 a abril de 2006, fueron aislados en botellas plásticas de 2.250 cc de capacidad, acondicionadas con tela de voile para ser trasladados al laboratorio. *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. (Fam. Amaranthaceae) “lagunilla” fue utilizada como substrato de alimentación (Fig. 1).

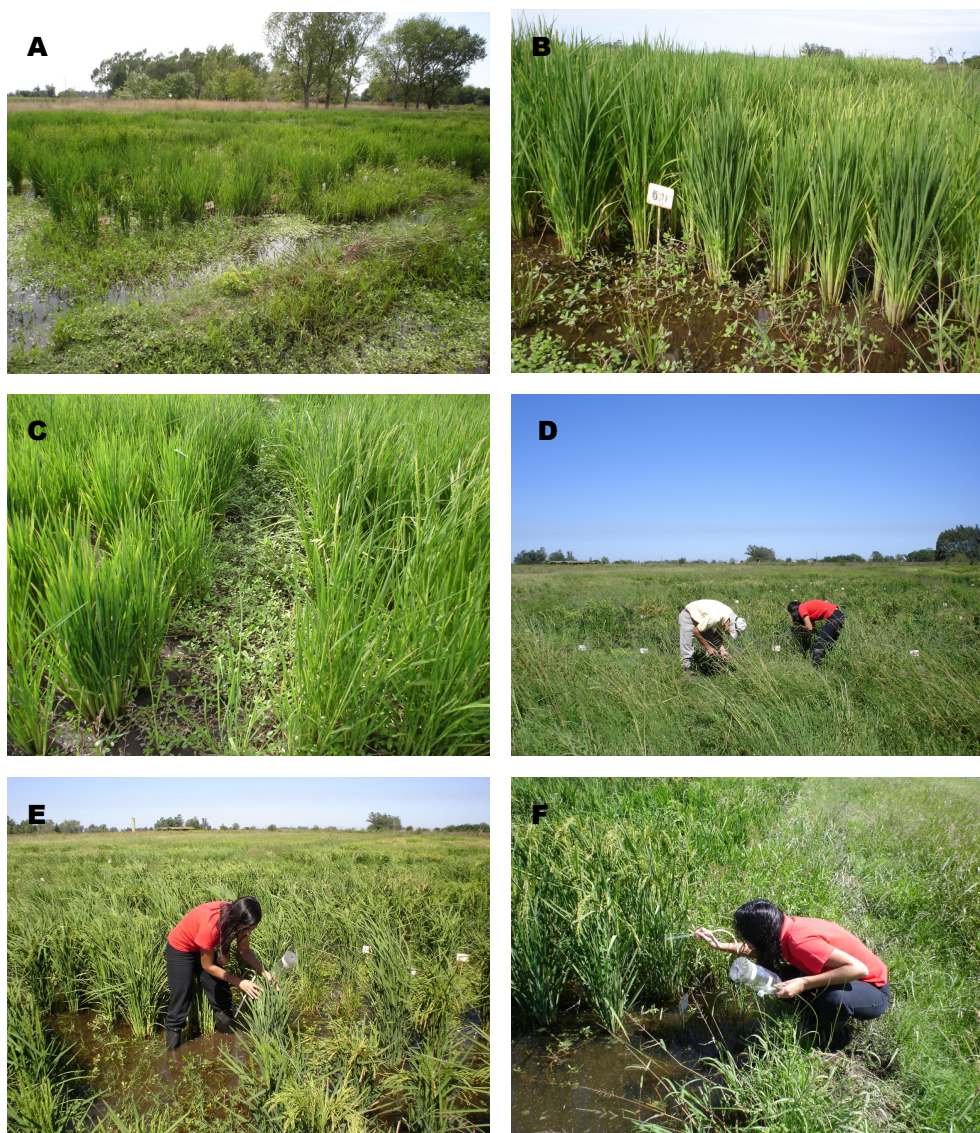


Fig. 1: *Cultivo de arroz.* **A-C:** Estado fenológico del cultivo (reproductivo) al iniciarse los muestreos con una frecuencia de dos veces por semana (febrero de 2005). **D-F:** Recolección de insectos mediante la utilización de aspiradores manuales.

Con motivo de conocer el resto de la fauna asociada a estos cultivares, se tomaron 3 muestras de 50 golpes de red en la vegetación espontánea aledaña a los mismos, en cada fecha de muestreo. La fauna capturada mediante red entomológica fue aislada dentro de recipientes de vidrio de 11 x 6,5 cm y transportada al laboratorio. En estas condiciones las muestras fueron colocadas en un freezer a -20°C durante una hora, al cabo de la cual todos los especímenes fueron examinados bajo microscopio binocular estereoscópico. Los componentes de la carpeta vegetal, a partir de los cuales se extrajeron los insectos, fueron herborizados y clasificados de acuerdo a Cabrera & Zardini (1978) y Petetin & Molinari (1992).

Los registros de temperatura y humedad se realizaron *in situ*, en el momento del muestreo, con la utilización de un termohigrómetro digital (TFA®, Alemania. Rango de temperatura: 0° - 50°C , rango de humedad: 25% - 95% HR), mientras que los climatológicos locales provinieron de la Estación Meteorológica de la Estación Experimental Julio Hirschhorn. Los datos cuali y

cuantitativos fueron organizados en planillas especialmente adecuadas para su posterior análisis.

V.2.2. Estudios de laboratorio:

Los insectos fueron mantenidos en cautividad dentro de los recipientes acondicionados como fue explicado anteriormente, en un bioterio, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo ($23 \pm 1^\circ \text{C}$, 49 - 63% HR y 10 horas de luz) (Fig. 2).

A los fines de detectar posibles infecciones fúngicas adquiridas en el campo, se realizaron observaciones cada 24 horas durante un período de 5 días, retirando los insectos muertos y colocándolos sobre cubre objetos dentro de cápsulas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril.

Las estructuras fúngicas fueron medidas a partir de preparaciones semipermanentes para microscopio óptico realizadas a partir del micelio desarrollado sobre los cadáveres o mantenido en medio de cultivo, en función de su disponibilidad. Las estructuras fúngicas de los hongos Entomophthorales fueron coloreadas con aceto orceína 1%, mientras que las de los hongos Hypocreales fueron montadas en agua destilada estéril para su observación “en fresco”, realizando luego preparaciones coloreadas con azul de algodón - lactofenol de Ammann 0,01% p/v. Los conidióforos, células conidiógenas, conidios y cuerpos hifales se observaron y midieron bajo microscopio óptico WILD M20, equipado con contraste de fases. Los datos merísticos fueron expresados como: largo mínimo – largo máximo x ancho mínimo – ancho máximo, seguidos del valor promedio entre paréntesis. Las especies fúngicas fueron identificadas y caracterizadas de acuerdo a claves y monografías taxonómicas específicas (Brady, 1979a; Minter & Brady, 1980; Keller, 1987, 1991; Balazy, 1993). Los insectos infectados y las preparaciones microscópicas de las especies fúngicas identificadas fueron depositados como material de herbario de referencia en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE).

Una vez concluidos los 5 días de observación, se efectuó el recuento y sexado de los ejemplares de *O. dimidiatus* recolectados. Los especímenes fueron previamente anestesiados en freezer (-20°C) por 5 minutos y examinados bajo microscopio binocular estereoscópico.

La totalidad de los datos obtenidos fue organizada en planillas para la confección de gráficos y la realización de análisis estadísticos de correlación entre factores climáticos tales como temperatura y humedad relativa, tomados en los momentos de muestreo, y los porcentajes de infección fúngica registrados ($\alpha = 0,01$) (STSC, Statgraphics, 1987).

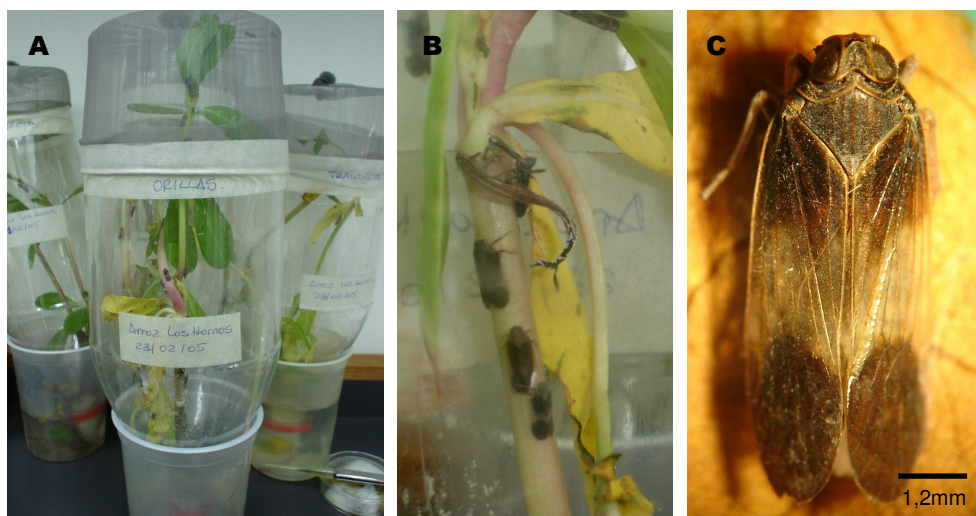


Fig. 2: *Mantenimiento de insectos en el laboratorio: A-B:* Adultos de *O. dimidiatus* aislados en botellas plásticas. **C:** Detalle de una hembra de *O. dimidiatus*.

Los aislamientos fúngicos fueron realizados en medios de cultivo sólidos tales como: agar extracto de malta 2% (AEM 2%), Sabouraud dextrosa agar enriquecido con 1% de extracto de levadura (SDA-Y 1%) (Ambos detallados en el Capítulo II), Sabouraud dextrosa agar suplementado con yema de huevo y leche (SEMA) (agar: 16g, dextrosa: 16g, peptona: 8g, extracto de levadura: 8g, agua destilada: 800ml, leche descremada: 8ml y yemas de huevo: 5, adaptado de Papierok & Hajek, 1997), Sabouraud maltosa agar enriquecido con 1% de extracto de levadura (SMA-Y 1%) (agar: 20g, extracto de malta: 20g, peptona: 10g, extracto de levadura: 10g y agua destilada: 1lt., adaptado de Lecuona, 1996) y medio líquido Glenn suplementado con 10% de suero fetal bovino (0,4% glucosa: 4g, 0,5% extracto de levadura: 5g, 0,65% lactalbúmina hidrolizada: 6,5g, 0,77% NaCl: 7,7g, 10% suero fetal bovino esterilizado por filtración y agua destilada: 1lt., Beauvais & Latgé, 1988). En todos los casos se adicionaron 100µl de antibiótico (penicilina G 40.000 unidades/ml y estreptomicina sulfato 80.000 unidades/ml) por cada 100ml de medio de cultivo.

Todos los aislamientos fúngicos fueron depositados en la colección micológica del CEPAVE y algunos de ellos en el Cepario de levaduras y hongos filamentosos del Instituto de Botánica “Carlos Spegazzini” (LPSC, La Plata, Buenos Aires, Argentina) y en la colección de cultivos de hongos entomopatógenos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (ARSEF, USDA-ARS, Ithaca, Nueva York, USA).

V.3. RESULTADOS Y DISCUSION

V.3.1. *Recolección de insectos*

En áreas arroceras ubicadas en la ciudad de Mercedes, provincia de Corrientes, no se registró la presencia de insectos debido a la aplicación de químicos utilizados para combatir las plagas.

En el cultivo de arroz ubicado en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, durante el año 2005, se recolectó un total de 855 ejemplares adultos de *O. dimidiatus* (431 hembras y 424 machos), observándose las mayores densidades en el período comprendido entre el 21 de febrero y el 30 de marzo. Durante el año 2006 se recolectó un total de 184 ejemplares adultos (102 hembras y 82 machos), observándose también las mayores densidades durante el mes de marzo. A lo largo de los 15 meses de muestreo se recolectó un total de 1.039 insectos adultos siendo 533 hembras y 506 machos (Tabla 3).

En ambos lotes, las especies vegetales a partir de las cuales se recolectaron los ejemplares de *O. dimidiatus* fueron, en orden de importancia: *Alternanthera philoxeroides* “lagunilla”, *Amaranthus quitensis* HBK. (Fam. Amaranthaceae) “yuyo colorado”, *Cirsium vulgare* (Savi) Airy - Shaw (Fam. Asteraceae) “cardo negro”, *Picris echioides* L. (Fam. Asteraceae) “raspasayos”, *Polygonum punctatum* Ell. (Fam. Polygonaceae) “hierba del bicho”, *Cyperus esculentus* L. (Fam. Cyperaceae), *Oryza sativa* L. (Fam. Graminae) “arroz”, *Paspalum dilatatum* Poir. (Fam. Graminae) “pasto miel”, *Brassica* sp. (Fam. Brassicaceae), *Anoda* sp. (Fam. Malvaceae) y *Melilotus albus* Medikus (Fam. Leguminosae). En la mayoría de los casos los individuos fueron recolectados desde los tallos y las hojas de todos estos sospechados hospederos de alimentación (Fig. 3).



Fig. 3: Vegetación aledaña a los cultivos de arroz desde donde fueron recolectadas las mayores densidades de *Oliarus dimidiatus* durante los muestreos. **A-B:** *O. dimidiatus* sobre tallos y hojas de *Alternanthera philoxeroides* "lagunilla". **C:** Dos adultos de *O. dimidiatus* sobre tallos de *Polygonum punctatum* "hierba del bicho". **D-E:** Adultos sobre tallos de *Amaranthus quitensis* "yuyo colorado" y *Cirsium vulgare* "cardo negro", respectivamente. **F:** Adulto sobre hojas de *Oryza sativa* "arroz".

Al efectuar los muestreos mediante el uso de red entomológica, se registró que el complejo de artrópodos asociado a la vegetación espontánea circundante a este cereal, estuvo conformado principalmente por representantes de los órdenes Diptera (48,6 %), Hemiptera

(20,1%), Hymenoptera (12,1%), Araneae (4,9%), Coleoptera (4,6%) y Collembola (3,8%); encontrándose en mucho menores porcentajes representantes de los órdenes Orthoptera (1,9%), Lepidoptera (1,0%) y Thysanoptera (0,9%) entre otros. Dentro de los Hemiptera los Fulgoromorpha y Cicadomorpha representaron 55,45% y, en orden decreciente de abundancia, las familias Cicadellidae (43,1%), Delphacidae (7,5%), Cixiidae (2,6%), Flatidae (1,6%), Membracidae (0,6%) y Dictiopharidae (0,4%). Los registros obtenidos mediante esta técnica de captura demuestran que los Cixiidae resultaron ser una de las tres familias mejor representadas, habiéndose capturado las mayores densidades durante los meses de noviembre y diciembre. Cabe destacar que a excepción de dos individuos del género *Cixiosoma*, dentro de la familia Cixiidae, *O. dimidiatus* fue la especie dominante. Mientras que las demás familias exhibieron mayor diversidad específica.

Los datos cuali y cuantitativos de la fauna asociada al agroecosistema arroz durante el período de muestreo se encuentran representados en las Tablas 1 y 2 y en el Gráfico 1.

Fecha de muestreo	Hemiptera								
	Auchenorrhyncha						Sternorrhyncha		Heteroptera
	Cicadellidae	Cixiidae	Delphacidae	Dictiopharidae	Flatidae	Membracidae	Aphididae	Aleyrodidae	
23/06/05	20	2	8	0	0	0	6	0	2
05/07/05	1	0	1	0	0	0	3	1	0
20/07/05	1	0	0	0	0	0	1	0	0
04/08/05	15	0	5	0	0	0	20	0	0
24/08/05	3	0	0	0	0	0	20	0	1
07/09/05	7	0	1	0	0	0	7	0	0
21/09/05	62	0	0	0	0	0	14	0	1
06/10/05	12	0	13	0	0	0	21	0	7
19/10/05	76	0	4	0	0	2	53	0	2
02/11/05	25	0	15	0	0	2	116	0	13
16/11/05	67	3	14	0	0	2	273	0	20
24/11/05	22	7	0	0	0	0	51	0	8
30/11/05	40	20	2	0	0	0	14	0	6
07/12/05	6	9	3	0	3	0	23	0	2
15/12/05	52	11	3	0	15	1	47	0	13
21/12/05	20	6	0	0	0	0	22	0	7
28/12/05	30	3	1	0	6	0	0	0	11
04/01/06	72	7	39	0	1	3	26	0	21
11/01/06	17	0	0	1	3	2	1	3	8
19/01/06	18	0	0	1	5	1	0	1	6
26/01/06	50	0	2	1	4	1	0	1	16
03/02/06	44	2	0	2	7	2	13	2	34
08/02/06	13	2	0	1	1	0	43	0	13
14/02/06	41	2	2	0	2	2	27	0	7
21/02/06	7	0	2	0	0	0	107	1	28
28/02/06	11	0	4	0	0	0	4	0	6
07/03/06	225	3	35	0	1	0	53	0	19
20/03/06	19	2	2	0	0	0	13	0	21
29/03/06	95	0	30	1	0	0	2	0	7
06/04/06	93	0	11	0	0	0	20	0	3
12/04/06	96	0	17	0	0	0	53	0	7
19/04/06	47	0	13	0	0	0	5	0	2
03/05/06	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	1311	79	227	7	48	18	1058	9	291

Tabla 1: Hemiptera asociados a los cultivos de arroz recolectados durante los meses de invierno, primavera, verano y otoño en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, Los Hornos, Buenos Aires, Argentina.

Fecha de muestreo	Orden												
	Acari	Araneae	Coleoptera	Collembola	Dictyoptera	Diptera	Hymenoptera	Lepidoptera	Neuroptera	Odonata	Orthoptera	Psocoptera	Thysanoptera
23/06/05	5	6	4	8	0	88	5	0	0	0	0	3	0
05/07/05	0	5	3	8	0	27	1	1	0	0	0	0	0
20/07/05	3	3	1	3	0	14	1	0	0	0	0	0	0
04/08/05	13	9	27	4	0	38	5	2	0	0	0	3	0
24/08/05	0	0	2	8	0	6	0	2	0	0	0	0	0
07/09/05	14	10	4	2	0	16	2	0	0	0	3	0	0
21/09/05	2	6	6	53	0	534	21	0	0	0	0	0	8
06/10/05	6	9	16	3	0	121	27	35	0	0	0	0	1
19/10/05	6	27	45	0	0	161	35	4	0	0	2	0	1
02/11/05	41	14	30	0	0	42	42	0	0	0	3	0	0
16/11/05	47	22	53	2	0	120	70	6	0	0	10	0	0
24/11/05	4	24	22	2	0	89	38	2	0	0	8	0	2
30/11/05	5	27	29	9	0	156	82	2	2	0	35	0	6
07/12/05	2	19	16	1	1	66	78	0	2	0	17	0	0
15/12/05	8	67	100	1	0	268	287	6	2	2	37	0	6
21/12/05	11	20	33	2	0	112	143	3	9	0	21	2	14
28/12/05	7	49	47	6	4	210	282	3	1	0	13	0	16
04/01/06	4	28	46	9	0	526	115	0	1	0	15	0	10
11/01/06	0	16	8	4	2	41	30	0	2	0	18	0	7
19/01/06	0	15	13	40	0	207	98	2	3	0	14	0	2
26/01/06	0	40	25	73	0	373	111	6	6	0	28	0	6
03/02/06	11	68	63	81	2	549	113	9	5	0	30	0	30
08/02/06	0	18	16	10	0	233	32	0	1	1	12	0	4
14/02/06	0	23	13	104	0	1787	24	1	2	0	11	0	2
21/02/06	1	18	6	50	0	134	17	23	0	0	5	0	3
28/02/06	0	27	5	79	0	183	21	7	2	4	2	0	0
07/03/06	0	53	32	9	0	>1000	19	36	1	5	4	0	5
20/03/06	0	29	14	0	0	132	28	0	0	2	0	0	1
29/03/06	0	28	13	5	0	111	22	2	0	0	2	1	6
06/04/06	2	33	16	3	0	701	42	0	0	2	4	0	3
12/04/06	2	25	7	0	0	187	26	0	0	1	2	0	4
19/04/06	0	13	2	0	0	135	19	0	0	0	2	0	2
03/05/06	0	6	1	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
Total	194	757	718	579	9	>7377	1836	152	39	17	298	9	139

Tabla 2: Artrópodos no Hemípteros asociados a los cultivos de arroz recolectados durante los meses de invierno, primavera, verano y otoño en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, Los Hornos, Buenos Aires, Argentina.

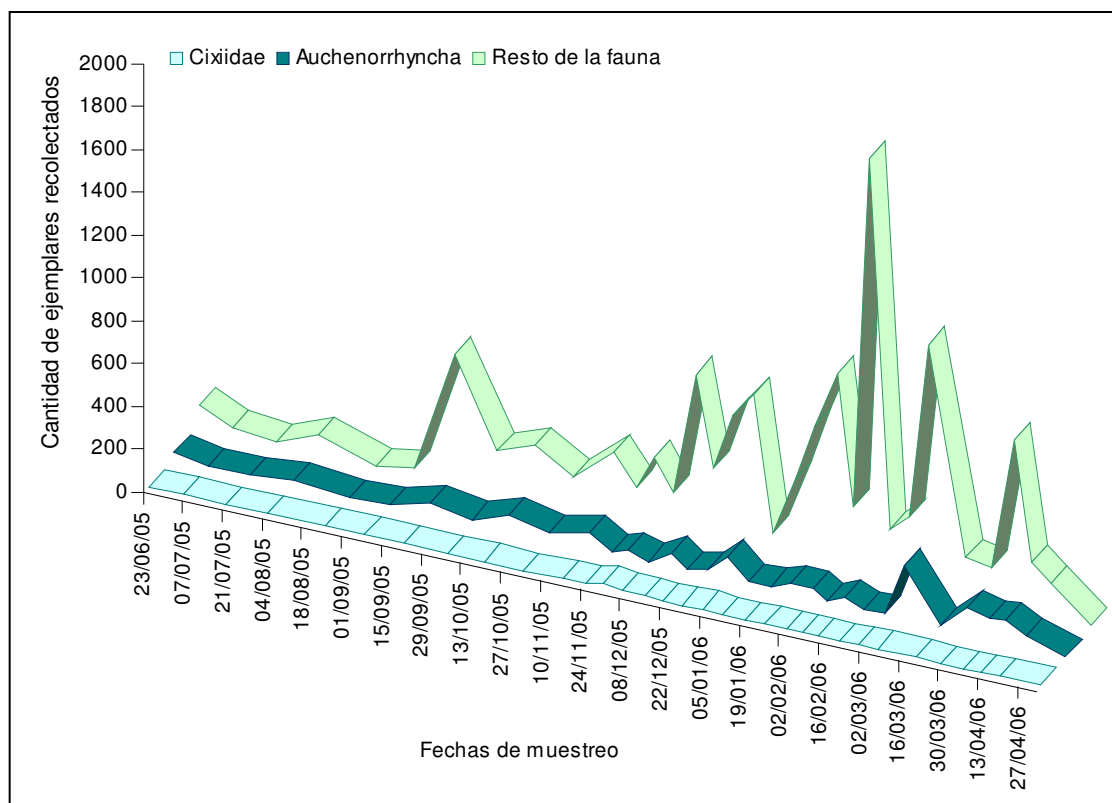


Gráfico 1: Representación de las densidades de la fauna recolectada con red sobre la vegetación aleña a los cultivos de arroz.

V.3.2. Identificación y caracterización de hongos entomopatógenos aislados de *Oliarus dimidiatus*

A partir de las infecciones fúngicas registradas se identificaron 4 géneros y 4 especies de hongos entomopatógenos afectando a *O. dimidiatus*. Estos fueron *Pandora* sp., *Conidiobolus coronatus* (Zygomycota: Entomophthorales), *Hirsutella* sp. y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). A continuación se presenta la ubicación taxonómica y caracterización de cada una de las especies fúngicas identificadas.

Phylum: Zygomycota

Clase: Zygomycetes

Orden: Entomophthorales

Familia: Entomophthoraceae

Pandora sp.

En los muestreos efectuados en el agroecosistema arroz durante el año 2005, *Pandora sp.* fue encontrado infectando a 41 hembras y 5 machos de *O. dimidiatus*, de un total de 431 y 419 respectivamente. Mientras que durante los muestreos efectuados durante los cuatro primeros meses de 2006 *Pandora sp.* sólo se manifestó en una hembra recolectada el 20 de marzo de un total de 102 hembras y 82 machos.

En el hospedador el hongo presentó un color blanco amarillento, surgiendo a través de las membranas intersegmentales del insecto y adhiriéndolo fuertemente al sustrato (Fig. 4 A-B). En los medios de cultivos utilizados para el aislamiento de esta especie fúngica (SDA-Y 1%, SEMA y Glenn) sólo se logró la descarga activa de los conidios sin conseguir la germinación de los mismos. Debido a la imposibilidad de su aislamiento, las medidas de las estructuras fúngicas fueron registradas directamente a partir del micelio desarrollado en los hospedadores.

Características micromorfológicas y merísticas:

Conidios primarios uninucleados, elipsoidales a ovoides, con una papila redondeada; 14,9 – 22,3 x 7,4 – 12,4 µm (18,1 x 8,8 µm) (7 series, 14 ejemplares, N = 372) (Fig. 4 C).

Conidios secundarios similares a los primarios y en algunos casos subesféricos; 9,9 – 16,1 x 6,2 – 12,4 µm (12,9 x 8,5 µm) (3 series, 7 ejemplares, N = 169) (Fig. 4 D).

Conidióforos ramificados y ensanchados por la formación de los conidios, los primeros alcanzaron medidas de 2,5 – 9,9 µm de ancho (5,3 µm) (4 series, 8 ejemplares, N = 53).

Cuerpos hifales esféricos, elipsoidales, alargados y multinucleados; 6,2 – 34,7 x 2,4 – 16,6 µm (20,7 x 8,2 µm) (4 series, 6 ejemplares, N = 35) (Fig. 4 E).

En algunos de los ejemplares se observó la presencia de cistidios (Fig. 4 F), pero no se registró el desarrollo de rizoides.

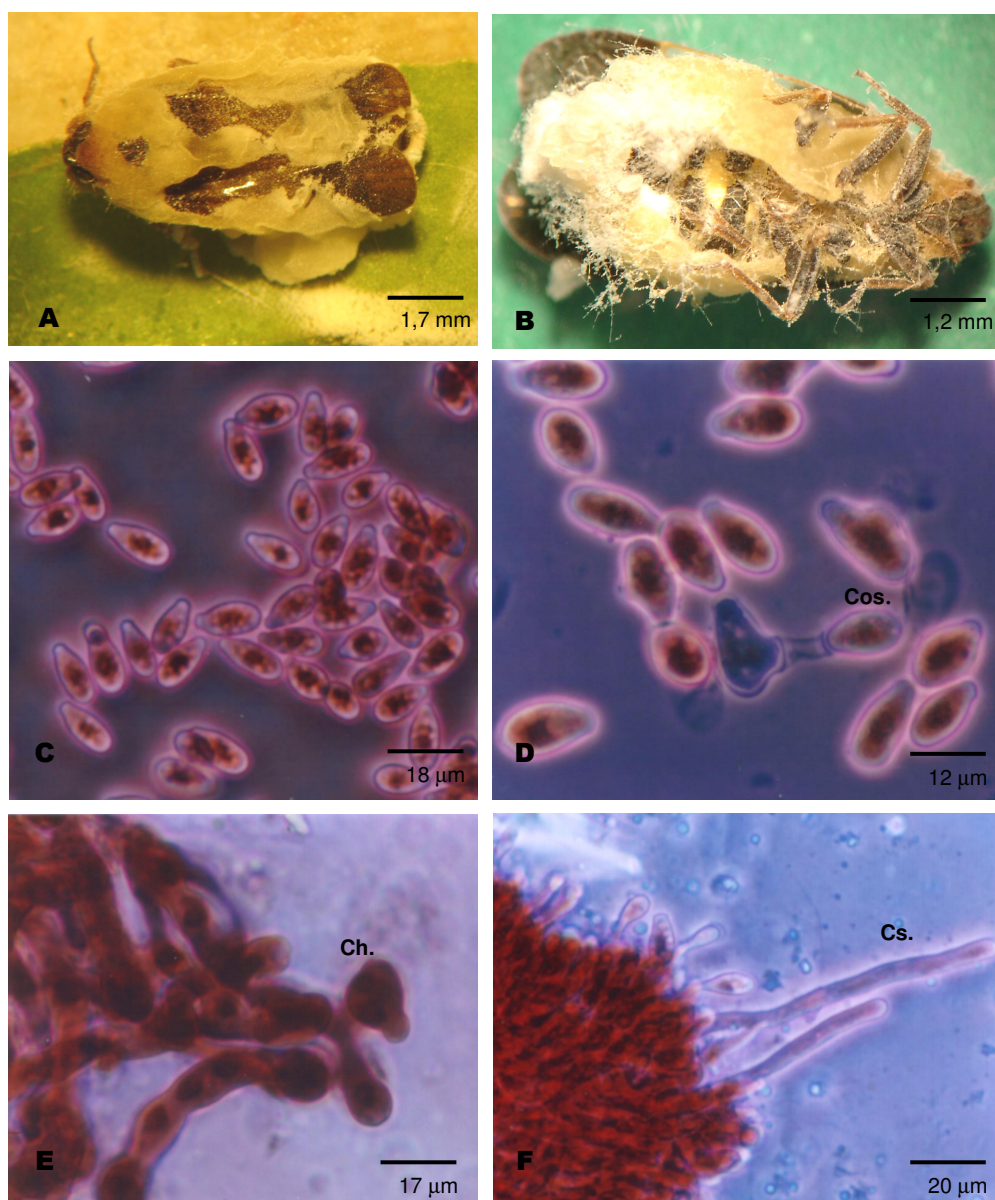


Fig. 4: *Pandora* sp. **A-B:** Infectando a hembras de *O. dimidiatus*. En la figura A puede observarse la descarga de conidios sobre el sustrato al que se encuentra adherido el insecto. **C:** Conidios primarios. **D:** Conidios primarios dando origen a conidios secundarios (Cos.). **E:** Cuerpos hifales (Ch.). **F:** Cistidios (Cs.).

Phylum: Zygomycota

Clase: Zygomycetes

Orden: Entomophthorales

Familia: Ancylistaceae

Conidiobolus coronatus

Conidiobolus coronatus fue detectado en una hembra de *O. dimidiatus* recolectada el 20 de marzo de 2006 y en forma conjunta con *Pandora* sp. en otra hembra recolectada el 28 de marzo de 2005. El hongo fue aislado en el medio de cultivo SDA-Y 1%. Todas las estructuras fúngicas fueron medidas a partir del micelio desarrollado en cultivo.

Características micromorfológicas y merísticas:

Conidios primarios esféricos, con una papila cónica o redondeada; $39,7 - 62,0 \times 34,7 - 52,0 \mu\text{m}$ ($51,7 \times 43,6 \mu\text{m}$) ($N = 30$).

Conidios secundarios producidos a partir de los primarios sobre cortos conidióforos, de morfología similar a los primarios; $27,3 - 47,0 \times 24,8 - 39,7 \mu\text{m}$ ($40,0 \times 33,0 \mu\text{m}$) ($N = 30$).

Microconidios producidos por conidióforos tubulares y cortos desarrollados alrededor de los conidios primarios; $14,9 - 22,3 \times 12,4 - 19,8 \mu\text{m}$ ($17,8 \times 15,6 \mu\text{m}$) ($N = 25$), (Fig. 5). En algunas de las preparaciones se detectó la presencia de escasos conidios vellosos.

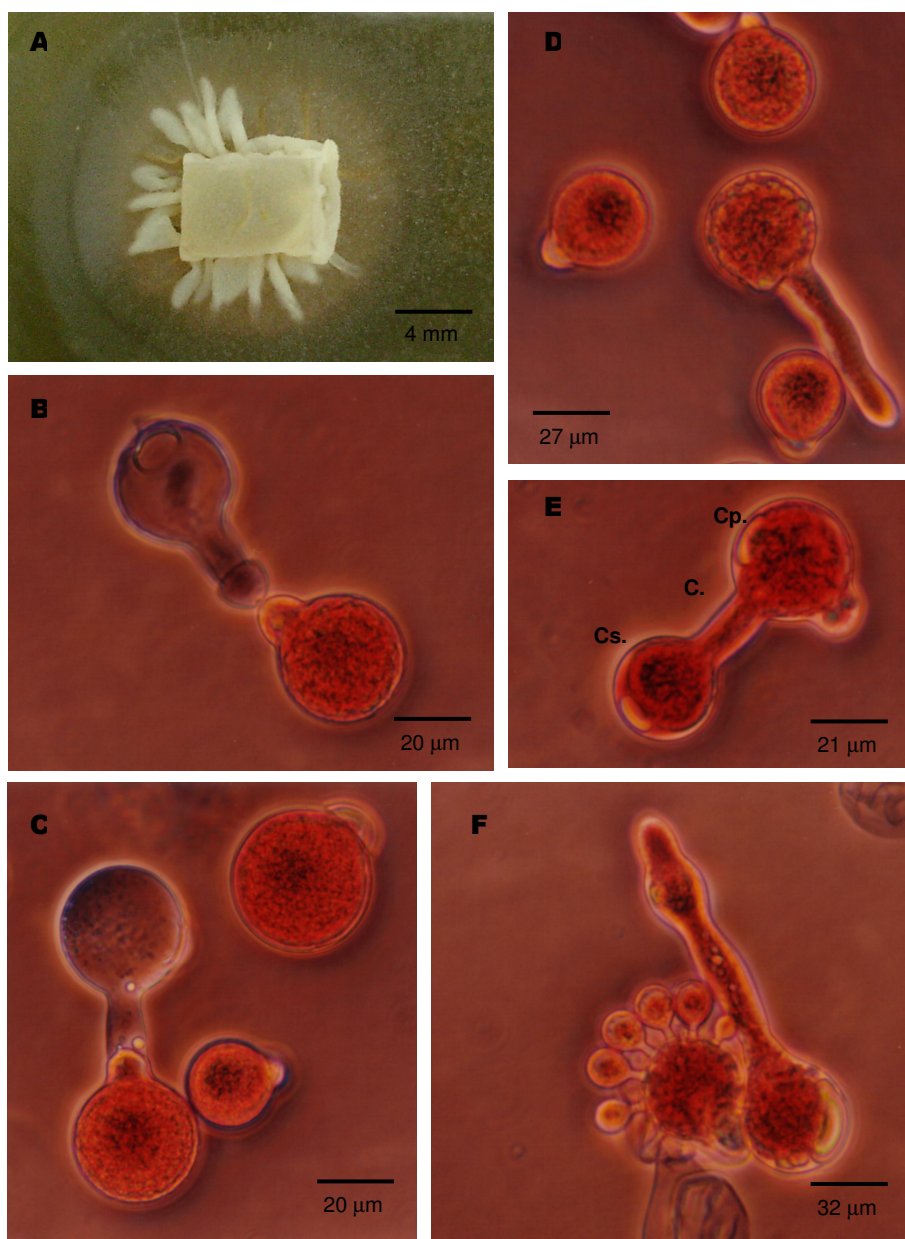


Fig. 5: *Conidiobolus coronatus*. **A:** Crecimiento en medio de cultivo SDA-Y 1%. **B-E:** Conidios primarios y secundarios coloreados con aceto orceína 1% (Cp.: conidio primario, C.: conidióforo, Cs.: conidio secundario) **F:** Microconidios coloreados con aceto orceína 1%.

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

***Hirsutella* sp.**

Hirsutella sp. fue observado infectando conjuntamente con *Pandora* sp. a una hembra de *O. dimidiatus*, recolectada el 2 de marzo de 2005. En el hospedador el hongo mostró una coloración blanquecina a castaño clara, surgiendo principalmente a través de las membranas intersegmentales de las patas. Debido al escaso material disponible el hongo no pudo ser cultivado, por lo cual las medidas de las estructuras fúngicas fueron registradas directamente a partir del micelio desarrollado en el hospedador.

Características micromorfológicas y merísticas:

Células conidiógenas o fiálides con forma de clava, laterales a las hifas, de paredes hialinas y lisas; $6,9 - 14,9 \times 1,5 - 2,0 \mu\text{m}$ ($8,9 \times 1,6 \mu\text{m}$) (N=25) (Fig. 6).

Conidios hialinos, aseptados, subcilíndricos o con forma de limón; $1,0 - 7,0 \times 1,0 - 2,0 \mu\text{m}$ ($2,5 \times 1,6 \mu\text{m}$) (N=25) (Fig. 6).



Fig. 6: *Hirsutella* sp. **A-B:** Fiálides y conidios coloreados con aceto orceína 1%.

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Beauveria bassiana

Beauveria bassiana fue aislado en medio de cultivo AEM 2% a partir de un ejemplar macho de *O. dimidiatus* recolectado el día 9 de marzo de 2005. El micelio fúngico de aspecto algodonoso y de color blanco intenso surgió a través de las membranas intersegmentales de todo el cuerpo del insecto.

Todas las estructuras fúngicas fueron medidas a partir del micelio desarrollado en cultivo (Fig. 7 A).

Características micromorfológicas y merísticas:

Fiálides dispuestas en grupos, con una porción globosa basal y un raquis bien desarrollado; $4,0 - 7,0 \times 2,0 - 3,5 \mu\text{m}$ ($5,0 \times 2,5 \mu\text{m}$) (N = 25).

Conidios hialinos, lisos y globosos a elipsoidales; $2,0 - 3,0 \times 2,0 - 2,5 \mu\text{m}$ ($2,3 \times 2,1 \mu\text{m}$) (N = 25) (Fig. 7 B).

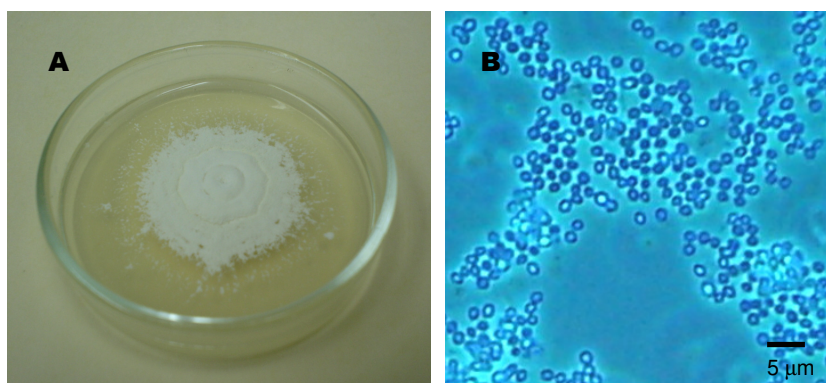


Figura 7: *Beauveria bassiana* **A:** Aspecto de una colonia cultivada en AEM 2% luego de 14 días de incubación a 24° C en oscuridad. **B:** Conidios coloreados con azul de algodón - lactofenol de Ammann.

Tanto *C. coronatus* como *B. bassiana* fueron depositados en las colecciones micológicas del CEPAVE y de ARSEFF bajo los números de acceso CEP 184 y ARSEF 7786 y CEP 189 y ARSEF 7776 respectivamente. *B. bassiana* fue depositado también en el cepario del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini bajo el número LPSC 902.

V.3.3. Estacionalidad y prevalencia de hongos entomopatógenos aislados de *O. dimidiatus*.

Las infecciones fúngicas fueron registradas casi sin interrupción desde mediados de febrero a mediados de abril de 2005 suprimiéndose desde entonces hasta fines de marzo de 2006. El 4,7% de los insectos desarrolló infección fúngica en el laboratorio, evidenciándose *Pandora* sp en 4,5% de los especímenes infectados. De este porcentaje 4% fueron hembras y 0,5% machos, lo que demuestra una relación de infección de 8:1. La mayoría de las infecciones fúngicas adquiridas en el campo se manifestaron en el laboratorio entre las 48 y las 72 horas de observación.

La población de adultos de *O. dimidiatus* presentó una estacionalidad bien definida a lo largo de los 15 meses de muestreo. Las mayores densidades de insectos se registraron entre los meses de febrero y abril de 2005, decaendo abruptamente durante mayo a octubre, para volver a aumentar a mediados de noviembre; la mayor cantidad de individuos fue recolectada en los meses de febrero (N = 155), marzo (N = 454), noviembre (N = 99) y diciembre (N = 121). Una estacionalidad similar fue registrada durante la segunda campaña.

Mediante la realización de análisis estadísticos se detectó una correlación relativamente débil entre el número de machos recolectados y el número de machos infectados ($r = 0,42$; $P = 0,002$), mientras la correlación fue algo más fuerte entre el número de hembras recolectadas y el número de hembras infectadas ($r = 0,57$; $P < 0,0000$). Considerando el número total de insectos recolectados, las infecciones fúngicas fueron más frecuentes en las hembras (N = 43/ 533) que en los machos (N = 6/ 506).

Respecto al efecto de los factores climáticos en el desarrollo de las infecciones fúngicas, los registros indican que no existió correlación entre el número de insectos infectados y los valores de humedad relativa ($r = 0,18$; $P = 0,19$) ni entre el número de insectos infectados y los valores de temperatura tomados *in situ* ($r = 0,023$; $P = 0,91$). No obstante, es de destacar que la mayor incidencia de infecciones fúngicas se detectó durante los meses en donde el cultivo permaneció inundado, hecho que podría demostrar la posible influencia de las condiciones microclimáticas en la estacionalidad de las poblaciones. A lo largo de los muestreos se observó que las mayores densidades de insectos hospedadores se correspondieron con temperaturas superiores a los 15° C (Gráfico 2) y que las infecciones fúngicas, a excepción de tres fechas de muestreo (16/2, 06/04 y 11/04/05), se manifestaron en los momentos en que el número de individuos recolectados fue más elevado.

En cuanto al aspecto epidemiológico, los registros indican que las infecciones fúngicas se mantuvieron en un porcentaje mínimo, no detectándose epizootias sobre el cultivo de arroz en este período (Gráfico 2).

Registros en otras latitudes demuestran que muchas especies de Entomophthorales, tales como *Pandora neoaphidis*, *Entomophthora muscae* y *Neozygites fresenii* entre otras, producen zygosporas en el hemocele que funcionan como verdaderas esporas de resistencia, permitiéndole al hongo sobrevivir en ausencia del hospedador o durante condiciones climáticas

desfavorables. Algunas especies fúngicas son capaces de pasar el invierno de otra manera, por ejemplo dentro de cadáveres o mediante infecciones cíclicas de hospedadores que actúan como reservorios (Carner, 1976; Remaudiere & Keller, 1980; Brandenburg & Kennedy, 1982; Keller, 1991, Balazy, 1993). Estos antecedentes permiten inferir que algunos de estos mecanismos de supervivencia pudieron ser utilizados por *Pandora* sp. para recolonizar el cultivo de arroz.

Fecha de muestreo	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Insectos recolectados			Insectos infectados			Especie fúngica
			M	H	Total	M	H	Total	
16/02/05	31	60	3	4	7	0	1	1	<i>Pandora</i> sp.
21/02/05	37	60	17	27	44	0	1	1	<i>Pandora</i> sp.
23/02/05	33	63	27	34	61	0	0	0	-
28/02/05	26	50	19	24	43	0	2	2	<i>Pandora</i> sp.
02/03/05	28	53	51	39	90	1	5	6	<i>Pandora</i> sp., <i>Hirsutella</i> sp.
09/03/05	26	33	43	50	93	1	3	4	<i>Pandora</i> sp., <i>B. bassiana</i>
10/03/05	28	45	23	22	45	0	3	3	<i>Pandora</i> sp.
14/03/05	29	54	22	26	48	2	6	8	<i>Pandora</i> sp.
16/03/05	28	64	44	32	76	0	2	2	<i>Pandora</i> sp.
21/03/05	26	49	15	25	40	1	7	8	<i>Pandora</i> sp.
23/03/05	20	64	8	11	19	1	1	2	<i>Pandora</i> sp.
28/03/05	27	68	10	18	28	0	8	8	<i>Pandora</i> sp., <i>C. coronatus</i> .
30/03/05	23	44	9	6	15	0	0	0	-
04/04/05	20	48	6	2	8	0	0	0	-
06/04/05	22	62	4	7	11	0	1	1	<i>Pandora</i> sp.
11/04/05	21	70	1	4	5	0	1	1	<i>Pandora</i> sp.
20/04/05	17	47	0	1	1	0	0	0	-
04/05/05	22	69	1	0	1	0	0	0	-
19/05/05	20	68	0	0	0	0	0	0	-
03/06/05	18	67	0	0	0	0	0	0	-
23/06/05	17	53	0	0	0	0	0	0	-
05/07/05	15	48	0	0	0	0	0	0	-
20/07/05	14	57	0	0	0	0	0	0	-
04/08/05	20	59	0	0	0	0	0	0	-
24/08/05	11	56	0	0	0	0	0	0	-
07/09/05	16	58	0	0	0	0	0	0	-
21/09/05	22	64	0	0	0	0	0	0	-
06/10/05	26	34	0	0	0	0	0	0	-
19/10/05	27	58	0	0	0	0	0	0	-
02/11/05	23	66	0	0	0	0	0	0	-
16/11/05	28	47	11	3	14	0	0	0	-
24/11/05	25	22	17	15	32	0	0	0	-
30/11/05	30	37	36	17	53	0	0	0	-
07/12/05	20	39	5	4	9	0	0	0	-
15/12/05	29	52	31	25	56	0	0	0	-
21/12/05	30	41	16	21	37	0	0	0	-
28/12/05	26	60	5	14	19	0	0	0	-
04/01/06	34	42	7	8	15	0	0	0	-
11/01/06	30	48	1	1	2	0	0	0	-
19/01/06	28	58	0	0	0	0	0	0	-

26/01/06	29	55	0	0	0	0	0	0	-
03/02/06	31	65	11	5	16	0	0	0	-
08/02/06	26	38	6	5	11	0	0	0	-
14/02/06	31	45	3	2	5	0	0	0	-
21/02/06	29	67	1	1	2	0	0	0	-
28/03/06	24	61	6	0	6	0	0	0	-
07/03/06	24	64	24	22	46	0	0	0	-
20/03/06	28	59	11	29	40	0	2	2	<i>Pandora sp., C. coronatus.</i>
29/03/06	22	37	2	4	6	0	0	0	-
06/04/06	27	53	6	14	20	0	0	0	-
12/04/06	35	38	3	9	12	0	0	0	-
19/04/06	21	57	1	2	3	0	0	0	-
03/05/06	11	99	0	0	0	0	0	0	-
Total			506	533	1039	6	43	49	

Tabla 3: Datos de fecha de muestreo, temperatura y humedad relativa tomados *in situ*, número de insectos recolectados, número de insectos infectados y especie fúngica registrada. Referencias: M = machos, H = hembras.

Mes-año de muestreo	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Precipitaciones totales (mm)
Enero-05	22,9 (16,7 - 29,5)	80 (55 - 100)	142,6
Febrero-05	21,8 (17,2 - 26,9)	91 (80 - 100)	88,8
Marzo-05	18,8 (13,5 - 24,4)	90 (73 - 99)	85,6
Abril-05	14,8 (9,1 - 20,8)	91 (78 - 100)	69,4
Mayo-05	12,8 (8,1 - 17,7)	92 (71 - 100)	23,6
Junio-05	12,2 (8,2 - 16,3)	98 (93 - 100)	65,2
Julio-05	10,5 (6,7 - 14,7)	97 (92 - 100)	69,6
Agosto-05	10,9 (6,3 - 15,7)	95 (86 - 100)	90,0
Septiembre-05	11,8 (7,0 - 17,0)	93 (83 - 100)	57,8
Octubre-05	14,6 (8,3 - 20,7)	86 (69 - 100)	44,0
Noviembre-05	20,0 (13,9 - 26,1)	79 (61 - 94)	52,6
Diciembre-05	19,6 (13,3 - 26,3)	79 (63 - 99)	92,4
Enero-06	22,6 (12,4 - 35,6)	73 (52 - 92)	201,0
Febrero-06	22,4 (10,6 - 33,5)	74 (57 - 90)	167,0
Marzo-06	18,5 (6,1 - 28,8)	78 (55 - 100)	98,1
Abril-06	16,2 (2,9 - 27,2)	80 (62 - 94)	57,2

Tabla 4: Datos de temperatura media (mínima - máxima), humedad media (mínima - máxima) y precipitaciones mensuales otorgados por la Estación Meteorológica de la Estación Experimental Julio Hirschhorn.

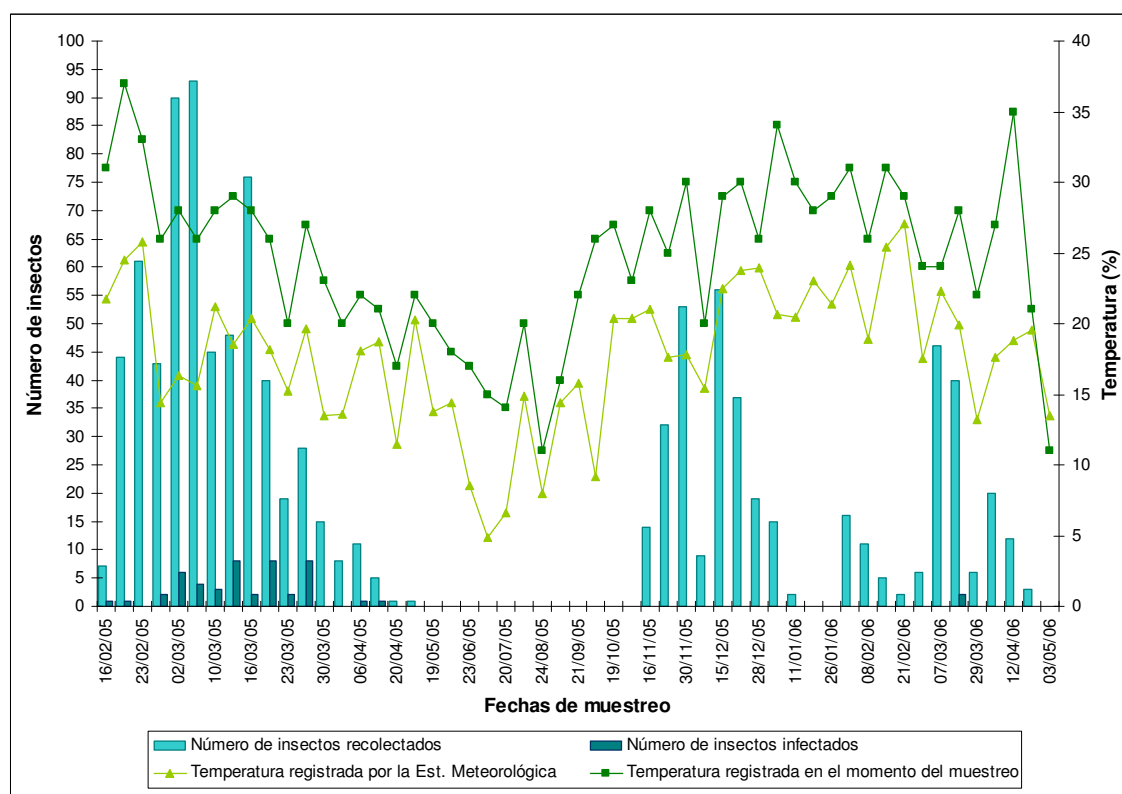


Gráfico 2: Número de ejemplares de *O. dimidiatus* recolectados vs. número de ejemplares con infecciones fúngicas en relación a las temperaturas medias registradas por la Estación Meteorológica de la Estación Experimental Julio Hirschhorn y a las temperaturas (cercanas a las máximas) registradas *in situ* en el momento de los muestreos.

V.4. CONCLUSIONES

A lo largo de los 15 meses de muestreo, en el área de estudio se recolectó, mediante el uso de aspiradores manuales, un total de 1.039 ejemplares adultos de *O. dimidiatus* (533 hembras y 506 machos).

Los registros obtenidos mediante muestreos efectuados con red entomológica sobre las malezas aledañas a los cultivos de arroz, demostraron que dentro de los Auchenorrhyncha asociados a este agroecosistema, las tres familias mejor representadas fueron: Cicadellidae (43,1%), Delphacidae (7,5%) y Cixiidae (2,6%).

La mayoría de las infecciones fúngicas adquiridas en el campo se manifestaron en el laboratorio entre las 48 y las 72 horas de observación. A partir de las mismas se identificaron y caracterizaron morfológicamente 4 géneros y 4 especies de hongos entomopatógenos. Estos fueron *Pandora* sp., *Conidiobolus coronatus*, *Hirsutella* sp. y *Beauveria bassiana*, los que constituyen los primeros registros para esta especie de Cixiidae en la Argentina.

Las infecciones fúngicas fueron registradas casi sin interrupción desde mediados de febrero a mediados de abril de 2005 suprimiéndose desde entonces hasta fines de marzo de 2006.

La especie fúngica dominante fue *Pandora* sp., afectando al 4,5% de los adultos de *O. dimidiatus* recolectados en el campo. De este porcentaje 4% fueron hembras y 0,5% machos, lo que demuestra una relación de infección de 8:1.

La población de adultos de *O. dimidiatus* presentó una estacionalidad bien definida a lo largo de los 15 meses de muestreo; las mayores densidades de insectos se registraron entre los meses de febrero y abril de 2005, decayendo abruptamente durante mayo a octubre, para volver a aumentar a mediados de noviembre. Una estacionalidad similar fue registrada durante la segunda campaña.

En cuanto al aspecto epidemiológico, los registros indican que las infecciones fúngicas se mantuvieron en un porcentaje mínimo, no detectándose epizootias sobre el cultivo de arroz durante las campañas 2004-2006.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- Aproximadamente 9% de los Auchenorrhyncha observados en este estudio presentó infecciones fúngicas. La diversidad de especies fúngicas detectadas en este grupo de insectos consistió en 11 géneros y 14 especies, en su mayoría pertenecientes a los órdenes Hypocreales y Entomophthorales.
- La mayor cantidad de individuos con infecciones fúngicas evidentes fue recolectada a partir de plantas de *Eryngium* sp., lo cual plantea la posibilidad de ampliar la búsqueda en éstas y otras Umbelíferas presentes en la Argentina.
- A excepción de tres especies de Fulgoromorpha, infectadas con dos especies de hongos Entomophthorales, en el resto de los Auchenorrhyncha las infecciones fueron ocasionadas por Hypocreales, siendo *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* las dos especies fúngicas más frecuentemente registradas. Sobre la base de los insectos estudiados se observó que los individuos en estado adulto fueron los más frecuentemente afectados.
- A partir de los insectos infectados y de muestras de suelo se lograron obtener 92 aislamientos puros, de los cuales 65 fueron caracterizados morfológicamente y de acuerdo a la viabilidad, *in vitro*, de los conidios. Se obtuvieron 9 morfotipos de colonias para *B. bassiana* y 9 para *M. anisopliae*.
- Del total de aislamientos fúngicos mantenidos en el laboratorio, 17 fueron seleccionados para evaluar su patogenicidad contra Delphacidae y Cicadellidae en función de la afinidad con los taxa hospedadores o de los sitios de procedencia.
- El aislamiento nativo *B. bassiana* CEP 147 (aislado de un Coleoptera Coccinellidae recolectado sobre plantas de maíz) resultó ser el más patogénico contra adultos de *Peregrinus maidis* y *Delphacodes kuscheli* (Delphacidae), ocasionando menores porcentajes de mortalidad en *Dalbulus maidis* (Cicadellidae). El micelio fúngico emergió y esporuló abundantemente en el 70% de los cadáveres, dentro de los 3 días de incubación.
- Los aislamientos nativos *B. bassiana* CEP 189 y *M. anisopliae* CEP 160 resultaron ser patogénicos contra adultos de *P. maidis*, ocasionando altos porcentajes de mortalidad tanto en machos como en hembras. Los insectos no manifestaron signos

externos de infección sino hasta después de su muerte, dónde la emersión y esporulación de ambas especies fúngicas se hizo rápidamente evidente.

- Los conidios hidrofóbicos de *B. bassiana* CEP 189 y de *M. anisopliae* CEP 160 fueron capaces de adherirse a la epicutícula de todas las regiones del cuerpo de los adultos de *P. maidis*, principalmente a aquellas conteniendo pelos.
- Las áreas propicias para la germinación fueron las esternales, próximas a los pelos sensitivos y a los poros de las glándulas cerosas, aunque los conidios germinados fueron muy escasos en comparación a los valores obtenidos *in vitro*.
- Sobre la superficie cuticular de los hospedadores se detectó la presencia de bacterias baciliformes en asociación a los propágulos infectivos de ambas especies fúngicas.
- La vía de penetración de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* más frecuentemente observada fue directamente a través de la cutícula de *P. maidis*.
- Los cuerpos hifales comenzaron a evidenciarse dentro del cuerpo del hospedador entre el cuarto y el quinto día posterior a la inoculación, ubicándose en todas las regiones del mismo. Hacia el sexto y séptimo día fue muy evidente la lisis de los tejidos, principalmente del muscular. En ninguno de los ejemplares infectados se evidenciaron reacciones de defensa celular.
- Las mayores densidades de hifas se encontraron dispuestas en el tejido graso y en la musculatura esquelética del vuelo.
- *Pandora* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales), especie fúngica dominante en cultivos de arroz, fue detectada infectando naturalmente a *Oliarus dimidiatus* (Fulgoromorpha: Cixiidae). Los Cixiidae resultaron ser una de las tres familias de Auchenorrhyncha mejor representadas en asociación a estos agroecosistemas.
- *Pandora* sp. fue registrada casi sin interrupción en el período comprendido entre mediados de febrero a mediados de abril de 2005, ocasionando porcentajes de infección menores al 5% y no registrando epizootias en estos cultivos.

PERSPECTIVAS

Los estudios biológicos e histopatológicos revelaron aspectos de la interacción patógeno – hospedador, tales como la capacidad de los microorganismos de adherirse, germinar y penetrar a través del tegumento del hospedador, de superar las barreras inmunológicas de defensa y de invadir rápidamente los tejidos, así como también la potencialidad de emerger y esporular sobre los cadáveres. Estos aspectos constituyen herramientas necesarias a la hora de implementar la utilización de los hongos entomopatógenos como agentes potenciales de control de plagas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han generado el planteo de futuros estudios con miras a ampliar el conocimiento de los hongos entomopatógenos como potenciales agentes de control de Auchenorrhyncha plagas de la agricultura en la Argentina:

- Si bien los resultados de las pruebas de patogenicidad resultan promisorios en condiciones de laboratorio, se requieren futuros estudios a campo que permitan evaluar su accionar contra estas plagas y sus enemigos naturales, a fin de optimizar la utilización de las especies nativas de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico.
- Las observaciones realizadas a nivel cuticular plantean la necesidad de ampliar los estudios de interacción patógeno-hospedador, los cuales deben apuntar a identificar los componentes cuticulares que podrían actuar como barreras inhibitorias para la germinación de los conidios fúngicos, como así también a estudiar *in vivo* e *in vitro* la acción antifúngica que pudieran ejercer los microorganismos asociados a la superficie cuticular de estos hospedadores.
- Si bien la cantidad de insectos con infecciones fúngicas asociadas a cultivos de arroz no superó el 5%, la ocurrencia de infecciones naturales en Fulgoromorpha asociados a este agroecosistema nos alienta a considerar a los hongos entomopatógenos como posibles agentes de control biológico de las principales plagas de este cereal registradas en América del Sur.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M. & Ikegami, T. 2005. Susceptibility of five species of thrips to different strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Entomol. Zool. 40 (4), 667-674.
- Aguda, R.M., Rombach, M.C., Im, D.J., & Shepard, B.M. 1987. Suppression of populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hom.; Delphacidae) in field cages by entomogenous fungi (Deuteromycotina) on rice in Korea. J. Appl. Entomol. 104, 167-172.
- Alee, L.L., Goettel, M.S., Golberg, A., Whitney, H.S. & Roberts, D.W. 1990. Infection by *Beauveria bassiana* of *Leptinotarsa decemlineata* larvae as a consequence of fecal contamination of the integument following per os inoculation. Mycopathologia 111, 17-24.
- Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos. En: Controle microbiano de insetos. Alves, S.B. (Ed.). Piracaiba, FEALQ. 1163 pp.
- Arneodo, J.D., Guzmán, F.A., Conci, L.R., Laguna, I.G. & Truol, G.A. 2002. Transmission features of Mal de Río Cuarto virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. Ann. Appl. Biol. 141, 195-200.
- Bałazy, S. 1993. Flora of Poland (Flora Polska), Fungi (Mycota). Polish. Acad. Sci., W. Szafer Inst. Botany, Kraków. 24, 1-356.
- Beauvais, A. & Latgé, P. 1988. A simple medium for growing Entomophthoralean protoplast. J. Invert. Pathol. 51, 175-178.
- Becnel, J.J. 1997. Complementary techniques: Preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. Lacey, L.A. (Ed.), Academic Press Inc., San Diego, California, USA. 409 pp.
- Berg, C. 1879. Hemiptera Argentina. An. Soc. Cient. Arg. 184-185.
- Berón, C.M. & Díaz, B.M. 2005. Pathogenicity of hyphomycetous fungi against *Cyclocephala signaticollis*. BioControl 50, 143-150.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C. 1983. Host recognition and specificity of entomopathogenic fungi. Contribution to the Symposium on "Infection processes of fungi", Bellagio, Italy.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. & Latgé, J.P. 1988. Nonspecific factors involved in the attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 54 (7), 1795-1805.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts. In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Cole, G.T. & Hoch, H.C. (Eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 101-127.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C. 1998. Insect immune defense system, Part III: Prophenoloxidase cascade and post-attachment processes of phagocytosis. In: Principles of insect pathology. Boucias, D.G. & Pendland, J.C. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA, pp. 499-537.
- Brady, B.L.K. 1979a. *Beauveria bassiana* C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 602. Commonwealth Agricultural Bureaux.

- Brady, B.L.K. 1979b. *Metarhizium anisopliae* C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 609. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Brandenburg, R.L. & Kennedy, G.G. 1982. Relationship of *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) to two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in field corn. J. Econ. Entomol. 75, 691-694.
- Burges, H.D. 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, New York. 949 pp.
- Butt, T.M., Wraight, S.P., Galaini-Wraight, S., Humber, R.A., Roberts, D.W. & Soper, R.S. 1988. Humoral encapsulation of the fungus *Erynia radicans* (Entomophthorales) by the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera). J. Invert. Pathol. 52, 49-56.
- Butt, T.M. & Goettel, M.S., 2000. Bioassays of Entomogenous fungi. In: Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. Navon, A. & Ascher, K.R.S. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 141-195.
- Cabrera, A.L. & Zardini, E.M. 1978. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. ACME S.A.C.I., Buenos Aires, Argentina. 755 pp.
- Cantwell, G.E. 1974. Insect diseases (2 vols.), Marcel Decker, New York.
- Carner, G.R. 1976. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two-spotted mite. J. Invert. Pathol. 28, 245-254.
- Cerenius, L., Thornquist, P.O., Vey, A., Johansson, M.W. & Soderhäll, K. 1990. The effect of the fungal toxin destruxina E on isolated crayfish hemocytes. J. Insect Physiol. 36, 785-789.
- Chen, C.C., Chao, C.H. Chen, Y.K., & Tsai, J.H. 1996. Comparative studies on the partial properties of three tenuiviruses occurring in Taiwan. Taichung District Agric. Improv. Sta. Research Bull. 50, 29-43.
- Chiu, S. 1979. Biological Control of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. In: Proc. Symp. Brown Planthopper Threat Rice Prod. Asia. IRRI, Los Baños 1-375.
- Chu, Y.I. & Hirashima, Y. 1981. Survey of Taiwanese literature on the natural enemies of rice leafhoppers and planthoppers. Esakia Occas. Pap. Hikosan Biol. Lab. Entomol. 16, 33-37.
- Consolo, V.F., Salerno, G.L. & Berón, C.M. 2003. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. BioControl 48, 705-712.
- Crouzel, I.S. de. 1973. Estudios sobre el control biológico de cochinillas Diaspididae que atacan cítricos en la República Argentina. Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario (IDIA) INTA 304, 15-39.
- Dagoberto, E. & Lecuona, R.E. 1982. Dinámica poblacional de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) e incidencia del daño en el cultivo. Estación Experimental Regional Agropecuaria Pergamino, Carpeta de Producción vegetal Maíz. T. IV Inf. N° 44.
- Davidson, E.W. 1981. Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allanheld: Osmun Publications. 562 pp.

- De Faria, M.R., Tigano, M.S., Fontes, E.M.G. & Lecuona, R.E. 1995. Characterization and virulence of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Isolates to eggs of *Deois flavopicta* (Stål) (Homoptera: Cercopidae). An. Soc. Entomol. Brasil 24 (3), 659-663.
- De Hoog, G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirochium* and *Acrodontium*. In: Studies in Mycology N° 1, pp. 4-10.
- De Santis, L., Dagoberto, E., Remes Lanicov, A.M.M. de & Tesón, A. 1988. Notas sobre *Anagrus armatus* (Hymenoptera- Mymaridae), parasitoide oófago de *Delphacodes kuscheli* (Homoptera- Delphacidae). Rev. Chilena Ent. 16, 93-95.
- Díaz, B.M. & Lecuona, R.E. 1995. Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) Deuteromycotina como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.) Agriscientia 12, 33-38.
- Dietrich, C.H. 2005. Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Fla. Entomol. 88 (4), 502-517.
- Döbel, H. & Denno, R. 1993. Predator-planthopper interactions. In: Planthoppers, their ecology and management. Denno, R. & Perfect, T. (Eds.). Chapman & Hall, New York, pp. 325-399.
- Doberski, J.M. & Tribe, H.T. 1980. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br. Mycol. Soc. 74 (1), 95-100.
- Edelstein, J.D. 2002. Epizootiología de *Nomuraea rileyi* (Deuteromycetes) sobre lepidópteros defoliadores en el cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Tesis del Doctorado en Ciencias Biológicas de La Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Edelstein, J.D. & Lecuona, R.E. 2003. Presencia del hongo entomopatógeno *Pandora gammae* (Weiser) Humber (Zygomycetes: Entomophthorales) en el complejo de orugas medidoras de la soja (Lepidoptera: Plusiinae) en Argentina. Rev. Invest. Agrop. (RIA) INTA 32 (1), 31- 38.
- Fargues, J. & Vey, A. 1974. Modalités d' infection des larves de *Leptinotarsa decemlineata* par *Beauveria bassiana* au cours de la mue. Entomophaga 19 (3), 311-323.
- Fargues, J. & Remaudiere, G. 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. Mycopathologia 62, 31-37.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smiths, N., Ouedraogo, A. & Rougier, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. Mycologia 89 (3), 383-392.
- Fawcett, G.L. 1915 Apuntes botánicos y micológicos. Un parásito fungívoro de las cochinillas. Rev. Indust. Agr. Tucumán 6, 529-530.
- Ferron, P. 1985. Fungal Control. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Eds.). Pergamon Press, Oxford. pp. 313-346.
- Fresa, R. 1971. El hongo *Entomophthora grylli* en tucuras. Rev. Invest. Agrop. (RIA) INTA 8 (2), 83-88.

- Fresa, R. 1979. Hongos entomopatógenos observados en larvas de lepidópteros perjudiciales para la República Argentina. Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario (IDIA) INTA 373, 149- 155.
- Fresa, D.J., Lenardón, S. & Marinelli, A. 1980. El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre *Galerucella luteola* Müller, plaga del olmo. Rev. Invest. Agropec. (RIA) INTA 25, 227- 232.
- Freytag, P.H. 1985. The insect parasites of leafhoppers, and related groups. In: The Leafhoppers and Planthoppers. Nault, L. & Rodriguez, J. (Eds.). Wiley, New York, pp. 423-467.
- Ghiggia, L.I., Fernández, R.V., Yasem, M. & Fernández, J.A. 2003. *Cladosporium* sp. sobre *Dialeurodes citrifolli* (Morgan) (Homoptera-Aleyrodidae) en plantaciones de limonero en la provincia de Tucumán. Revta. Agron. N. O. Argent. 31 (1-4), 27-30.
- Gillespie, A.T. 1984. The potential of entomogenous fungi to control glasshouse pests and brown plant hopper of rice. PhD. Thesis, Southamton University.
- Giménez Pecci, M. P., Olivera, E., Resende, R., Borgogno, C., Nome, C.F. & Laguna, I.G. 2000. Occurrence of Maize rayado fino virus in maize in Argentina. Plant Disease 84 (a), 1046.
- Giménez Pecci, M. P., Laguna, I.G., Avila, A.O., Remes Lanicov A.M.M. de, Virla, E., Borgogno, C., Nome, C.F. & Paradell, S. 2002. Difusión del Corn Stunt Spiroplasma del maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y el vector (*Dalbulus maidis*) en la Argentina. Rev. Fac. Agronomía 105 (1), 1-8.
- Giménez Pecci, M. P., Carpane, P., Laguna, I.G., Virla, E. & Paradell, S. 2005. Experimental Transmission of Corn Stunt Spiroplasma from Argentina. Annual Meeting Phytopathology, APS. Actas.Vol. 95, N°6. (Supplement): 8-9. Austin, Texas, USA.
- Goettel, M.S., St. Leger, R.J., Rizzo, N.W., Stapes, R.C. & Roberts, D.W. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. Journal of General Microbiology 135, 2233-2239.
- Goettel, M.S. & Inglis, G.D. 1997. Fungi Hyphomycetes. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey, L.A. (Ed.), Academic Press Inc., San Diego, California, USA. 409 pp.
- Grocott, R.G. 1955. A stain for fungi in tissue sections and smears, using Gomori's methenamine-silver nitrate method. American Journal Clinical Pathology 25, 975-979.
- Hanlin, R.T. & Ulloa, M. 1988. Atlas of Introductory Mycology. Hunter Textbooks Inc., North Carolina, USA. 196pp.
- Hedlund, R.C. & Pass, B.C. 1968. Infection of the alfalfa weevil, *Hypera postica*, by the fungus *Beauveria bassiana*. J. Invert. Pathol. 11, 25-34.
- Holdom, D.G., Taylor, P.S. & Soper, R.S. 1988. Activity of Entomophthoran Fungal Isolates (Zygomycetes) against *Nilaparvata lugens* and *Sogatodes orizicola* (Homoptera: Delphacidae). J. Invert. Pathol. 52, 221-230.
- Hou, R.F. & Chang, J. 1985. Cellular defense response to *Beauveria bassiana* in the silkworm, *Bombyx mori*. Appl. Entomol. Zool. 20, 118-125.
- Hubner, J. 1958. Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. Arch. Mikrobiol. 29, 257-276.

- Humason, G.L. 1962. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, San Francisco and London. 468 pp.
- Humber, R.A. & Hansen, K.S. 2005. USDA-ARS Collection of entomopathogenic fungal cultures. http://www.ppru.cornell.edu/mycology/ARSEF_Culture_Collection.htm
- Hung, S. & Boucias, D.G. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. J. Invert. Pathol. 60, 152-158.
- Hung, S., Boucias, D.G. & Vey, A. 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense of *Spodoptera exigua*. J. Invert. Pathol. 61, 179-187.
- Huxham, I.M., Lackie, A.M. & Mc Corkindale, N.J. 1989. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity in insects. J. Insect Physiol. 35, 97-105.
- Ibarra-Aparicio, G., Moya-Raygoza, G. & Berlanga-Padilla, A. 2005. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Delong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). Folia Entomol. Mex. 44 (1), 1-6.
- Inch, J.M.M., Humphreys, A.M., Trinci, A.P.J. & Gillespie, A.T. 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). Trans. Br. Mycol. Soc. 87 (2), 215-222.
- Jauch, C. & Ogloblin, A. 1953. Un hongo parásito de acridios. Revista de Investigaciones Agrícolas 7 (3), 193-212.
- Kanga, L.H.B., Jones, W.A., Humber, R.A. & Boyd Jr., D.W. 2004. Fungal pathogens of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). Fla. Entomol. 87 (2), 225-228.
- Keller, S. 1987. Arthropod – pathogenic Entomophthorales of Switzerland. I. *Conidiobolus*, *Entomophaga* and *Entomophthora*. Sydowia Annals Mycologia 40, 122-167.
- Keller, S. 1991. Arthropod – pathogenic Entomophthorales of Switzerland. II. *Erynia*, *Eryniopsis*, *Neozygites*, *Zoophthora* and *Tarichium*. Sydowia Annals Mycologia 43, 39-122.
- Kerwin, J.L. 1984. Fatty acid regulation of the germination of *Erynia variabilis* conidia on adults and puparia of the lesser housefly, *Fannia canicularis*. Can. J. Microbiol. 30, 158-161.
- Lacey, L.A. & Brooks, W.M. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey, L.A. (Ed.), Academic Press Inc., San Diego, California, USA. 409 pp.
- Laguna, G., Remes Lenicov, A.M.M. de, Virla, E., Avila, A.O., Giménez Pecci, M.P., Herrera, P., Garáy, J., Ploper, D. & Mariani, R. 2002. Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 61(1-2), 87-97.
- Lane, B.S., Humphreys, A.M., Thompson, K. & Trinci, A.P.J. 1988. ATP Content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as a criterion of spore viability. Trans. Br. Mycol. Soc. 90 (1), 109-148.

- Lane, B.S., Trinci, A.P.J. & Gillespie, A.T. 1991. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. Mycol. Res. 95 (7), 829-833.
- Latch, G.C.M. 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture-inhabiting insects. N.Z.J. Agric. Res. 8, 384-396.
- Latch, G.C.M. 1976. Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinoceros* to some entomogenous fungi. Entomophaga 21, 31-38.
- Lecuona, R.E. 1996. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. En: Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Lecuona, R.E. (Ed.), M. Mas, Buenos Aires. pp. 143-150.
- Lecuona, R.E. & Díaz, B.M. 2001. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a los hongos entomopatógenos *Nomuraea rileyi*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Rev. Invest. Agrop. (RIA) INTA 30 (1), 25-42.
- Lenardón, S.L., March, G.J. & Ornaghi, J.A. 1999. Virus del Mal de Río Cuarto en maíz. En: Enfermedades de los cultivos extensivos e intensivos. Hoja informativa. Instituto de Fitopatol. y Fisiol. Veg. (IFFIVE-INTA), Córdoba, Argentina.
- Lewis, L.C. & Cossentine, J.E. 1986. Season long intraplant epizootics of entomopathogens, *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta*, in a corn agroecosystem. Entomophaga 31, 363-369.
- Lewis, L.C. & Bing, L.A. 1991. *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control: Program for immediate and season-long suppression. Can. Entomol. 123, 387-393.
- López Lastra, C.C. 1988. Nuevas especies de insectos hospedadores para el hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en Argentina y consideraciones sobre su patogenia. Rev. Fac. Agr. UNLP. Tomo LXIV (entregas 1y2), 42-46.
- López Lastra, C.C. 1989a. Primera cita de *Cordyceps sobolifera* (Ascomycotina: Pyrenomycetes) patógeno de insectos en la República Argentina. Bol. Soc. Arg. Bot. 6 (1-2), 59-60.
- López Lastra, C.C. 1989b. Nuevos hospedadores para los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas, en la República Argentina. Rev. Soc. Ent. Arg. 47 (1), 94.
- López Lastra, C.C. & Scorsetti, A.C. 2006. Hongos Entomophthorales patógenos de insectos de la República Argentina. Revista de Biología Tropical. (En prensa).
- Madelin, M.F. 1963. Diseases caused by hyphomycetous fungi. In: Insect pathology, an advanced treatise Vol 2. Steinhaus, E.A. (Ed.). Academic Press, New York. 687 pp.
- Marchionatto, J.B. 1934. Algunos hongos entomógenos comunes en la República Argentina y las posibilidades de su aplicación agrícola. Rev. Fac. Agr. y Vet. Univ. Buenos Aires 7, 571- 584.
- Marchionatto, J.B. 1935. Nuestros árboles frutales. Lucha contra los insectos por medio de hongos. Almanaque del Ministerio de Agricultura, Buenos Aires. pp. 225- 226.

- Mariani, R., Vera, L. & Virla, E. 1996. Aportes al conocimiento de *Doru lineare* (Eschs. 1822) (Dermaptera: Forficulidae), un insecto de importancia agronómica en el Noroeste Argentino. CIRPON Rev. Invest. 10 (1-4), 13-18.
- Mariani, R. & Remes Lenicov, A.M.M. de. 2000/2001. *Tagosodes orizicolus* (Muir, 1926), vector del "virus de la hoja blanca del arroz" (HBV) en la República Argentina (Homoptera - Delphacidae). Revista de la Facultad de Agronomía 104 (2), 151-156.
- Masson, P. 1928. Carcinoids (argentaffin cell tumors) and nerve hyperplasia of the apendicular mucosa. American Journal of Pathology 4, 181-211.
- Mc Cauley, V.J.E., Zacharuk, R.Y. & Tiline, R.D. 1968. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). J. Invert. Pathol. 12, 444-459.
- Mead, F.W. & Kramer, J.P. 1982. Taxonomic study of the planthopper genus *Oliarus* in the United States (Homoptera: Fulgoroidea: Cixiidae). Trans. Amer. Ent. Soc. 107, 381-569.
- Metcalf, Z.P. 1936. General Catalogue of the Hemiptera. Fascicle IV, Part 2. Smith College, Northampton, Mass., USA. 269 pp.
- Mikkelsen, D.S. & Datta, S.K. 1991. Rice Culture. In: Volume Rice Production. Luh, B.S. (Ed.). Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 103-186.
- Minter, D.W. & Brady, B.L. 1980. Mononematous species of *Hirsutella*. Trans. Br. Mycol. Soc. 74 (2), 271-282.
- Nault, L.R., & Bradfute, O.E. 1979. Corn stunt: Involvement of a complex of leafhopper-borne pathogens. In: Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents. Maramorosch, K. & Harris, K. F. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 561-586.
- Nault, L.R. & Ammar, E.D. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. Ann. Rev. Entomol. 34, 503-529.
- Nome, S.F., Lenardón, S.L., Raju, B.C., Laguna, I.G., Lowe, S.K. & Docampo, D. 1981. Association of Reovirus-like particles with "Enfermedad de Río IV" of maize in Argentina. Phytopathologische Zeitschrift 101, 7-15.
- Ogloblin, A. & Jauch, C. 1943. Reacciones patogénicas de los acridios atacados por *Aspergillus parasiticus*. Revista Argentina de Agronomía 10, 256-267.
- Olmi, M. & Virla, E. 1993. "Contribution to the knowledge of the Dryinidae of Argentina (Hymenoptera, Chrysidoidea)". Phytophaga (Palermo, Italia) 4, 57-67.
- Onions, A.H.S. 1979. *Paecilomyces farinosus*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 613. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Papierok, B. & Hajek, A.E. 1997. Fungi: Entomophthorales. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey, L.A. (Ed.), Academic Press Inc., San Diego, California, USA. 409 pp.
- Pekrul, S. & Gula, E.A. 1979. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. J. Invert. Pathol. 34, 238-247.
- Petetin, C.A. & Molinari, E.P. 1992. Reconocimiento de las malezas de la República Argentina. Clave para su determinación en base al color de las flores. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, Argentina. 231 pp.

- Poprawski, T.J., Marchal, M. & Robert, P.H. 1985. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stage to five entomopathogenic hyphomycetes. *Environ. Entomol.* 14, 247-253.
- Poprawski, T.J., Parker, P.E., & Tsai, J.H. 1999. Laboratory and field evaluation of hyphomycete insect pathogenic fungi for control of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 28, 315-321.
- Rayner, R.W. 1970. Mycological Colour Chart. In: Commonwealth Institute Kew, Survey British Mycological Society
- Reissig, W.H, Heinrichs, E.A., Litsinger, J.A., Moody, K., Fiedler, L., Mew, T.W. & Barrion, A.T. 1986. Illustrated Guide to Integrated Management in Rice in Tropical Asia. Intern. Rice Res. Inst. Los Baños, Laguna, Philippines.
- Remaudiere, G. & Keller, S. 1980. Systematic revision of genera of the Entomophthoraceae with entomopathogenic potential. *Mycotaxon* 11, 323-338.
- Remes Lenicov, A.M.M. de, Tesón, A., Dagoberto, E., & Huguet, N. 1985. Hallazgo de uno de los vectores del "Mal de Río Cuarto" del maíz. *Gaceta Agronómica* 5 (25), 251-258.
- Remes Lenicov, A.M.M. de, Tesón, A., Dagoberto, E. & Paradell, S. 1992. Acción del parasitoide *Elenchus tenuicornis* (Kirby) sobre la densidad poblacional de *Delphacodes kuscheli* Fennah (Insecta: Strepsiptera, Homoptera: Delphacidae). *Rev. Asoc. Cs. Nat. Litoral* 22, 1-9.
- Remes Lenicov, A.M.M. de & Virla, E. 1999a. Homópteros vectores de interés fitosanitario: un problema creciente en la Argentina (Insecta-Homoptera-Auchenorrhyncha). *Rev. Soc. Ent. Arg.* 58 (1-2), 43-47.
- Remes Lenicov, A.M.M de & Virla, E.G. 1999b. Delfácidos asociados a cultivos de maíz en la República Argentina (Insecta-Homoptera-Delphacidae). *Revista de la Facultad de Agronomía* 104 (1), 1-15.
- Remes Lenicov, A.M.M de & Mariani, R. 2001. Hallazgo del vector del virus del mosaico del maíz *Peregrinus maidis* (Homoptera – Delphacidae). *Rev. Soc. Ent. Arg.* 60 (1-4), 89-92.
- Remes Lenicov, A.M.M de, Laguna, G., Paradell, S. & Virla, E. 2002. Leafhoppers and planthoppers as vectors of corn diseases in Argentina. 11th International Auchenorrhyncha Congress. Potsdam / Berlin. Alemania, 89-90.
- Rice, W.C. & Choo, H.Y. 2000. Rice Pests. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Lacey, L.A. & Kaya, H.K. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 425-446.
- Rodríguez Pardinia, P.E., Laguna, I.G., Dagoberto, E. & Truol, G. 1998. Wheat: a new natural host for the virus Mal de Río Cuarto in the endemic disease area (Río Cuarto, province of Córdoba, Argentina). *Plant Disease* 82 (2), 149-152.
- Rombach, M.C., Aguda, R.M & Roberts, D.W. 1986a. Biological control of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) with dry mycelium applications of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Philipp. Ent.* 6, 613-619.
- Rombach, M.C., Aguda, R.M., Shepard, B.M. & Roberts, D.W. 1986b. Infection of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environ. Entomol* 15, 1070-1073.

- Rombach, M.C., Humber, R.A., & Evans, H.C. 1987a. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf-and planthoppers of rice. Trans. Br. Mycol. Soc. 88, 451-459.
- Rombach, M.C., Rombach, G.M., & Roberts, D.W. 1987b. Pathogens of insect pests of rice: a bibliography. Insect Sci. Appl. 8, 197-210.
- Rosengaus, R.B., Jordan, C., Lefebvre, M.L. & Traniello, J.F.A. 1999. Pathogen alarm behavior in a termite: a new form of communication in social insects. Naturwissenschaften 86, 544-548.
- Rothschild, G. 1966. A study of a natural population of *Conomelus anceps* (German) (Hom.: Delphacidae) including observations on predation using the precipitin test. J. Anim. Ecol. 35, 413-434.
- Samson, R.A. 1974. "*Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes". In: Studies in Mycology N° 6. BAARN. Institute of the Royal Netherlands. Academy of Science and Letters. pp. 38-40.
- Schabel, H.G. 1976. Green muscardine disease of *Hylobius pales* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). Z. Ang. Entomol. 81, 413-421.
- Schabel, H.G. 1978. Percutaneous infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. J. Invert. Pathol. 31, 180-187.
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A. & Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationships to *Bionectria ochroleuca* and notes on other *Gliocladium*-like fungi. Mycologia 90, 365-385.
- Schroers, H.J. 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. Studies in Mycology 46. CBS Utrecht. 214 pp.
- Shah, P.A., Kooyman, C. & Paraiso, A. 1997. Surveys for fungal pathogens of locust and grasshoppers in Africa and Near East. In: Goettel, M. & Johnson, D. (Eds.). Microbial control of grasshoppers and locusts. Mem. Entom. Soc. Can. 171, 27-35.
- Seibeneicher, S.R., Vinson, S.B. & Kenerley, C.M. 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. J. Invert. Pathol. 59, 280-285.
- Smith, R.J., Pekrul, S. & Grula, E.A. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). J. Invert. Pathol. 38, 335-344.
- Soares, G.G. Jr., Marchal, M. & Ferron, P. 1983. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviridae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) at two different temperatures. Environ. Entomol. 12, 1886-1890.
- Sosa Gómez, D.R. & Alves, S.B. 1983. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. I. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. CIRPON Rev. Invest. 1(3), 83- 102.
- Sosa Gómez, D.R. & Alves, S.B. 1984. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Producción de conidios en distintos medios de cultivo y sobre cadáveres de *Diatraea saccharalis* (F.). CIRPON Rev. Invest. 2 (1-2), 5-25.

- Sosa Gómez, D.R., Ricci, G. & Nasca, A.J. 1985. Efecto de *Hirsutella thompsonii* Fisher var. *thompsonii*, sobre larvas y adultos de *Coccidophilus citricota* Brethes y *Lindorus lophanthae* (Blaisdell) (Col.; Coccinellidae). CIRPON Rev. Invest. 3 (1-2), 73-77.
- St Leger, R.J., Cooper, R.M. & Charnley, A.K. 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. J. Invert. Pathol. 52, 459-470.
- St Leger, R.J. 1991. Integumental as a barrier to microbial infections. In: The physiology of insect epidermis. Retnakaran, A. & Binnington, K. (Eds.), Australia: CSIRO. pp. 286-307.
- STSC. 1987. Statgraphics User's Guide, Version 4.0. Graphic software system, STSC, Rockville, MD.
- Swezey, O.H. 1936. Biological control of the sugar cane leafhopper in Hawaii. Bull. Hawaiian Sugar Planters' Assoc. Exp. Sta. 21, 57-101.
- Tesón, A. & Remes Lenicov, A.M.M. de. 1989. Contribución al estudio de los fulgoroideos argentinos IV. (Homoptera - Fulgoroidea). Observaciones sobre tres especies halladas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). Rev. Soc. Ent. Arg. 47 (1-4), 101-107.
- Tigano – Milani, M.S., de Faria, M.R., Lecuona, R.E., Sartori, M.R., Arima, E.Y. & Díaz, B.M. 1995. Análise de patogenicidade e germinação do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolado no Distrito Federal. An. Soc. Entomol. Brasil 24 (1), 53-60.
- Triapitsyn, S. & Virla, E. 2004. A new *Anagrus* (Hymenoptera: Mymaridae) from Argentina, egg parasitoid of *Delphacodes sitarea* (Hemiptera: Archaeorrhyncha: Delphacidae). Fla. Entomol. 87 (3), 383-385.
- Tsai, J.H., & Wilson, S.W. 1986. Biology of *Peregrinus maidis* with descriptions of immature stages (Homoptera: Delphacidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 79, 395-401.
- Tsai, J.H. & Falk, B.W. 1993. Viruses and mycoplasmal agents affecting maize in the Tropics. In: Chiu, R. J. & Yeh, Y. (Eds.), Proc. Symposium on Plant Virus and Virus-like Diseases. 434. pp.
- Vasicek, A., Dal Bello, G.M. & Battaglino, N.A. 1995. El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como potencial agente biocontrolador del coleóptero *Xanthogelaruca luteola* (Müller). Bol. Micol. 10 (1-2), 13- 17.
- Velázquez, P.D., Arneodo, J.D., Guzmán, F.A., Conci, L.R. & Truol, G.A. 2003. *Delphacodes haywardi* Muir, a new natural vector of *Mal de Río Cuarto virus* in Argentina. J. Phytopathol. 151, 669-672.
- Vestergaard, S., Butt, T.M., Bresciani, J., Gillespie, A.T., & Eilenberg, J. 1999. Light and electron microscopy studies of the infection of the Western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invert. Pathol. 73, 25-33.
- Vey, A. & Fargues, J. 1977. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. J. Invert. Pathol. 30, 207- 215.
- Virla, E. 1992. Biología de *Pseudogonatopus chilensis* Olmi, 1989 (Hym.- Dryinidae). Acta Entomol. Chilena 19, 123-127.

- Virla, E., Remes Lenicov, A.M.M. de & Paradell, S. 1990/91. Presencia de *Dalbulus maidis* sobre maíz y teosinte en la República Argentina (Insecta - Homoptera - Cicadellidae). Rev. Fac. Agronomía 66/67, 23-30.
- Virla, E. & Rafael, J.A. 1997. Datos bionómicos preliminares y descripción de la hembra de *Cephalops penepauculus* (Hardy) (Diptera - Pipunculidae) un parasitoide de Delphacidae (Auchenorrhyncha) en Argentina. CIRPON Rev. Invest. 10 (1-4), 33-36.
- Virla, E. & Olmi, M. 1998. Presencia de *Haplogonatopus hernandezae* Olmi, 1984 (Hymenoptera, Dryinidae) en Argentina. Acta Zool. Lilloana 44 (2), 409-410.
- Virla, E. 1999. Aportes preliminares acerca de la bionomía de *Paracentrobia subflava* (Hym.: Trichogrammatidae), parasitoide de Homópteros Cicadeloideos Argentinos. Rev. Soc. Ent. Arg. 58 (3-4), 17-22.
- Virla, E.G. 2000. Aportes al conocimiento del complejo de enemigos naturales de *Exitianus obscurinervis* (Insecta-Cicadellidae). Boletín de Sanidad vegetal "Plagas", Madrid – España, 26, 365-375.
- Virla, E.G. 2001. Notes on the biology of *Anagrus breviphragma* (Hymenoptera, Mymaridae), natural enemy of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (Hemiptera, Cicadellidae) and others plant diseases vectors in South America. Boletín de Sanidad vegetal "Plagas", Madrid – España, 27(2), 239-247.
- Virla, E. G. 2004. Biología de *Gonatopus bonaerensis* (Hymenoptera: Dryinidae), enemigo natural de Delphacidae (Hemiptera) en Argentina. Rev. Fac. Agron. 105 (2), 18-26.
- Virla, E., Miotti, I., Giménez Pecci, M.P., Carpane, P. & Laguna, G. 2004. *Peregrinus maidis* (Hem.: Delphacidae), new experimental vector of the "Mal de Rio Cuarto" disease to corn. Biocell 28 (1), 54 (abs. 31).
- Vivas, L.E. & Clavijo, S. 2000. Fluctuación poblacional de *Tagosodes orizicolus* (Muir) 1926 (Homoptera: Delphacidae) en el sistema de riego Río Guárico, Calabozo, estado Guárico, Venezuela. Bol. Entomol. Venez. 15 (2), 217-227.
- Wagner, B.L. & Lewis, L.C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. 66 (8), 3468–3473.
- Waloff, N. & Thompson, P. 1980. Census data and analysis of populations of some leafhoppers (Auchenorrhyncha: Homoptera) of acidic grassland. J. Anim. Ecol. 49, 395-416.
- Walstad, J.D., Anderson, R.F. & Stambaugh, W.J. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). J. Invert. Pathol. 16, 221-226.
- Wheeler, A.G. Jr. 2003. Bryophagy in the Auchenorrhyncha: seasonal history and habits of a moss specialist, *Javesella opaca* (Beamer) (Fulgoroidea: Delphacidae). Proc. Entomol. Soc. Washington 105, 599-610.
- Wilson, M.R. & Claridge, M.F. 1991. Handbook for the identification of leafhoppers and planthoppers of rice. Wilson, M.R. & Claridge, M.F. (Eds.). CAB International, Oxon, UK. 142 pp.
- Wilson, S.W., Denno, R.F., Mitter, C. & Wilson, M.R. 1994. Evolutionary patterns of host plant use by delphacid planthoppers and they relatives. In: Planthoppers: They Ecology and Management. Denno, R.F. & Perfect, T.J. (Eds.). Chapman & Hall, Inc., New York, pp. 7-113.

- Wilson, S.W. 2005. Keys to the families of Fulgoromorpha with emphasis on planthoppers of potential economic importance in the Southeastern United States (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Florida Entomologist* 88 (4), 464-481.
- Wraight, S.P., Butt, T.M., Galaini-Wraight, S., Allee, L.L., Soper, R.S. & Roberts, D.W. 1990. Germination and infection process of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leaf hopper, *Empoasca fabae*. *J. Invert. Pathol.* 56, 157-174.
- Yasem de Romero, M. 1984a. Primera cita de *Cordyceps dipterigena* Berk. & Br. (= *Hymenostible dipterigena* Petch) para la República Argentina. *CIRPON Rev. Invest.* 2 (1-2), 65-69.
- Yasem de Romero, M. 1984b. Hongos entomógenos identificados en algunas especies de cochinillas (Homoptera: Coccoidea) de los cítricos en Tucumán. *CIRPON Rev. Invest.* 2 (3-4), 97- 113.
- Yasem de Romero, M. 1985. *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas en áfidos de la provincia de Tucumán. *CIRPON Rev. Invest.* 3, 63-66.
- Zacharuk, R.Y. 1970a. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. *J. Invert. Pathol.* 15, 63-80.
- Zacharuk, R.Y. 1970b. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and appressoria. *J. Invert. Pathol.* 15, 81-91.
- Zacharuk, R.Y. 1970c. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host Integument. *J. Invert. Pathol.* 15, 372-396.
- Zacharuk, R.Y. 1970d. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. *Can. J. Microbiol.* 17, 525-529.
- Zare, R. & Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section Prostata IV, The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73, 1-50.